

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado

Medikuntzako Gradua / Grado en Medicina

# **Evaluación del tratamiento con curcumina, $\alpha$ - tocoferol y dexmedetomidina en la amortiguación del daño por isquemia-reperfusión intestinal**

Egilea /Autor:

**Xabier Velasco Oraa**

Zuzendaria / Director:

**Ignacio García-Alonso Montoya**

## ABSTRACT

**Background:** Intestinal ischemia-reperfusion is still a relevant clinical problem, especially in newborns and in the elderly. In this piece of work, we check the utility of curcumin and dexmedetomidine to overcome the damage induced by reperfusion, both locally and in distant organs, using  $\alpha$ -tocopherol as a comparison.

**Methods:** In female WAG/RijHsd rats, the superior mesenteric artery was clamped for 1 h.; then animals were allowed 4 h of reperfusion. For biochemical and histological analysis, the animals were then sacrificed. To study intestinal absorption, D-Xylose was administered after 4 hours of reperfusion, and 1 h later the animals were sacrificed. Curcumin (200 mg/kg, oral gavage) was given 24 h and 2 h before clamping;  $\alpha$ -tocopherol (20 mg/kg IP) was administered 2 h before ischemia, and dexmedetomidine (10 or 40 mg/kg SC) was given 15 minutes before ischemia.

**Results:** All of the treatments reduced histological damage and improved absorption of D-Xylose. Only dexmedetomidine (with any of the doses) improved renal function (it reduced both creatinine and urea in serum). The elevation of liver enzymes in serum was not improved by any of the drugs.

**Conclusion:** The three drugs proved useful, though  $\alpha$ -tocopherol was more efficient than the other two regarding histological damage, and only dexmedetomidine restored D-Xylose absorption to normal values.

## RESUMEN

**Introducción:** La isquemia-reperfusión intestinal continúa siendo un problema clínico relevante, especialmente en neonatos y ancianos. En este trabajo comprobamos la utilidad de la curcumina y la dexmedetomidina para mitigar el daño inducido por la perfusión, tanto de manera local como en órganos distantes, utilizando como comparador el  $\alpha$ -tocoferol.

**Material y métodos:** En ratas hembra WAG/RijHsd, se pinzó la arteria mesentérica superior durante 1 hora, seguido de 4 h de perfusión. Para las determinaciones bioquímicas e histológicas, los animales fueron en última instancia sacrificados. Para estudiar la absorción intestinal se administró D-Xilosa tras 4 horas de perfusión y 1 h después se sacrificaron los animales. Se administró curcumina (200 mg/kg, oral) 24 h y 2 h antes del pinzamiento; se administró  $\alpha$ -tocoferol (20 mg/kg IP) 2 h antes de la isquemia y dexmedetomidina (10 o 40 mg/kg SC) 15 minutos antes de la isquemia.

**Resultados:** Todos los tratamientos redujeron el daño histológico y mejoraron la absorción de la D-Xilosa. Sólo la dexmedetomidina (con cualquiera de las dosis) mejoró la función renal (redujo tanto la creatinina como la urea en suero). Ninguno de los fármacos mejoró la elevación de las enzimas hepáticas en el suero.

**Conclusiones:** Los tres fármacos resultaron útiles, aunque el  $\alpha$ -tocoferol fue más eficaz que los otros dos en cuanto al daño histológico, y solo la dexmedetomidina restableció la absorción de la D-xilosa a valores normales.

## ABSTRAKTUA

**Sarrera:** Hesteetako iskemia/birperfusioa auzi kliniko garrantzitsua da oraindik, jaioberrietan eta adinekoetan bereziki. Lan honetan egiaztatu dugu kurkumina eta dexmedetomidina baliagarriak al diren birperfusioak eragindako kaltea arintzeko, bai modu lokalean bai urrutiko organoetan, konparatzaile gisa  $\alpha$ -tokoferola erabiliz.

**Material eta tresnak:** WAG/RijHsd arratoi emeetan, goiko arteria mesenterikoa pintzatu zen ordubetez, 4 orduko birperfusioa jarraituz. Zehaztapen biokimiko eta histologikoak egin ahal izateko, animaliak sakrifikatu ziren. Hesteetako xurgapena aztertzeko, D-Xilosa eman zen, 4 orduko birperfusioaren ondoren, eta ordubete geroago animaliak sakrifikatu ziren. Kurkumina eman zen (200 mg/kg, ahotik) 24 ordu eta 2 ordu lehenago;  $\alpha$ -tokoferola eman zen (20 mg/kg IP) iskemia baino 2 ordu lehenago, eta dexmedetomidina (10 edo 40 mg/kg SC) iskemia baino 15 minutu lehenago.

**Emaitzak:** Tratamendu guztiek kalte histologikoa murriztu eta D-Xilosaren xurgapena hobetu zuten. Dexmedetomidinak soilik (edozein dosirekin) hobetu zuen giltzurrun-funtzioa (bai kreatinina bai urea serumean murriztu zituen). Farmako batek ere ez zuen hobetu serumeko entzima hepatikoen igoera.

**Ondorioak:** Hiru farmakoak erabilgarriak izan dira, nahiz eta  $\alpha$ -tokoferola beste biak baino eraginkorragoa izanda kalte histologikoari dagokionez, eta soilik dexmedetomidinak berrezarri izan du D-xilosa balio normaletara xurgatzea.

## INDICE DE CONTENIDOS

Abstract .....	II
Resumen .....	III
Abstraktua .....	IV
1. Introducción .....	1
1.1. Concepto .....	1
1.2. Epidemiología .....	1
1.2.1. Factores de riesgo.....	1
1.2.2. Presentación clínica.....	1
1.3. Clasificación de la isquemia mesentérica .....	1
1.3.1. Isquemia obstructiva .....	2
1.3.2. Isquemia no obstructiva .....	2
1.4. Anatomía del sistema vascular esplácnico .....	2
1.5. Fisiopatología de la isquemia mesentérica.....	3
1.5.1. Mecanismos para la restauración del flujo sanguíneo .....	3
1.5.2. Efectos de la isquemia sobre el metabolismo del enterocito .....	3
1.5.3. Consecuencias de la liberación de ROS.....	4
1.5.4. Activación de los procesos inflamatorios agudos durante el periodo de reperusión .....	5
1.5.5. Efectos a nivel sistémico .....	5
1.6. Diagnóstico .....	6
1.7. Tratamiento .....	7
1.7.1. Tratamiento inicial .....	7
1.7.2. Tratamiento específico. Técnicas.....	8

1.8. Fármacos experimentales .....	8
1.8.1. Curcumina .....	8
1.8.2. $\alpha$ -tocoferol .....	9
1.8.3. Dexmedetomidina .....	10
2. Hipótesis y objetivos .....	11
2.1. Hipótesis.....	11
2.2. Objetivos .....	11
3. Material y métodos.....	13
3.1. Materiales .....	13
3.1.1. Animales .....	13
3.1.2. Fármacos .....	15
3.2. Métodos.....	16
3.2.1. Inducción de la anestesia.....	16
3.2.2. Procedimiento quirúrgico.....	16
3.2.3. Histología .....	18
3.2.4. Estudio funcional del intestino mediante la prueba de la D-Xilosa.....	22
3.2.5. Determinaciones enzimáticas.....	23
3.2.6 Análisis estadístico.....	24
4. Resultados .....	25
4.1. Grado de lesión histológica.....	25
4.2. Prueba de la absorción de la D-Xilosa .....	27
4.3. Parámetros bioquímicos .....	28
4.3.1. Urea.....	28
4.3.2. Creatinina .....	28
4.3.3. GPT-ALT .....	29

4.3.4. GOT-AST.....	30
4.3.5. Creatinquinasa (CK) .....	31
4.3.6. Lactato deshidrogenasa (LDH) .....	32
5. Discusión.....	33
5.1. Idoneidad del modelo experimental .....	33
5.1.1. Tiempo de isquemia y reperfusión.....	33
5.1.2. Fármacos empleados .....	35
5.1.3. Técnica de clampaje empleada.....	36
5.1.4. Valoración del daño histológico .....	36
5.1.5 Valoración del funcionalismo intestinal.....	37
5.2. Efectos de los diferentes tratamientos a nivel histológico .....	38
5.2.1. $\alpha$ -tocoferol .....	38
5.2.2. Curcumina .....	38
5.2.3. Dexmedetomidina .....	39
5.3. Repercusión sistémica de la reperfusión del intestino isquémico .....	40
5.4. Efecto sobre la capacidad absorbitiva del intestino .....	42
6. Conclusiones .....	44
7. Bibliografía .....	45
Anexo I – Tablas adicionales .....	55
Anexo II – Índice de abreviaturas .....	59

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. CONCEPTO**

La isquemia mesentérica aguda es una afección potencialmente mortal que ocurre cuando existe una disminución abrupta del flujo sanguíneo intestinal, dando como resultado un suministro inadecuado de O<sub>2</sub> y nutrientes que conduce a un infarto intestinal (1).

### **1.2. EPIDEMIOLOGIA**

Se trata de un cuadro potencialmente mortal, con una letalidad del 50% en caso de no tratarse adecuadamente (2), mientras que su incidencia global es del torno de 1 de cada 1000 ingresos hospitalarios (3). La isquemia mesentérica –o intestinal– aguda puede darse por diversos motivos, aunque la causa más común es el origen cardioembólico, dándose aproximadamente en un 50% de los casos (4,5).

#### **1.2.1. Factores de riesgo**

Hay diversos factores de riesgo involucrados en la isquemia mesentérica aguda. Los principales son, en orden de frecuencia, la fibrilación auricular (7,7-79%), la enfermedad arterial coronaria (13-75%), la insuficiencia cardíaca (2,4-29%), estados de hipercoagulabilidad (2,4-29%) o las enfermedades valvulares (3,3-11%) (6).

#### **1.2.2. Presentación clínica**

La presentación clínica más sensible de la isquemia mesentérica aguda es el dolor abdominal agudo, seguido de náuseas y vómitos, diarrea y en algunos casos, sangrado rectal (6,7). Aunque el dolor abdominal intenso sea un dato clave, hay veces que puede diagnosticarse erróneamente con otras situaciones clínicas, o incluso a veces, obviar el diagnóstico en casos de isquemias leves o de corta duración. Es por ello por lo que para una aproximación clínica inicial adecuada deben tenerse en cuenta no solo los síntomas y signos, sino también los factores de riesgo acompañantes.

### **1.3. CLASIFICACIÓN DE LA ISQUEMIA MESENTÉRICA**

Existen dos tipos de isquemia intestinal: obstructiva y no obstructiva:

### 1.3.1. Isquemia obstructiva

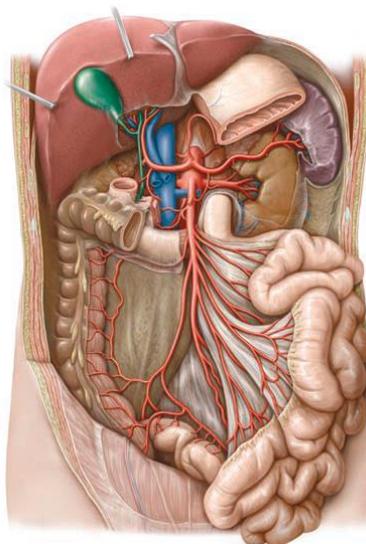
Puede deberse habitualmente a lesiones parietales como la aterosclerosis o a émbolos de origen distal (como el cardiaco) que obstruyen súbitamente la luz del vaso, impidiendo su perfusión de manera total o parcial.

### 1.3.2. Isquemia no obstructiva

Hablamos de isquemia no obstructiva cuando ésta es debida a una perfusión insuficiente, sin que exista un bloqueo absoluto del árbol arterial. Esto puede ocurrir por una hipotensión arterial generalizada por reducción de la volemia, por fallo en la función impulsora del corazón, por una vasoconstricción esplácnica, etc.

## 1.4. ANATOMÍA DEL SISTEMA VASCULAR ESPLÁCNICO

La circulación esplácnica se caracteriza por ser un sistema vascular rico en circulación colateral con múltiples vasos comunicantes. La arteria mesentérica superior nace de la cara ventral de la aorta abdominal suprarrenal, desciende por detrás del páncreas y origina ramas que irrigan al intestino delgado desde el yeyuno y al intestino grueso hasta la porción proximal del colon transverso (**figura 1**).



**Figura 1. Territorios anatómicos irrigados por la arteria mesentérica superior.** Incluye el intestino delgado desde el yeyuno hasta el tercio proximal del colon transverso. Extraído de Anatomía Humana, Pró. 2017.

La circulación colateral permite la compensación del flujo sanguíneo local mediante la vasodilatación de arterias permeables próximas en caso de que una zona del intestino

quedase privada de flujo sanguíneo. Sin embargo, en situaciones en las que se da la obstrucción de grandes vasos (como la arteria mesentérica superior) dicha compensación es insuficiente, pudiendo ocasionar grave compromiso tisular.

## **1.5. FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA MESENTÉRICA**

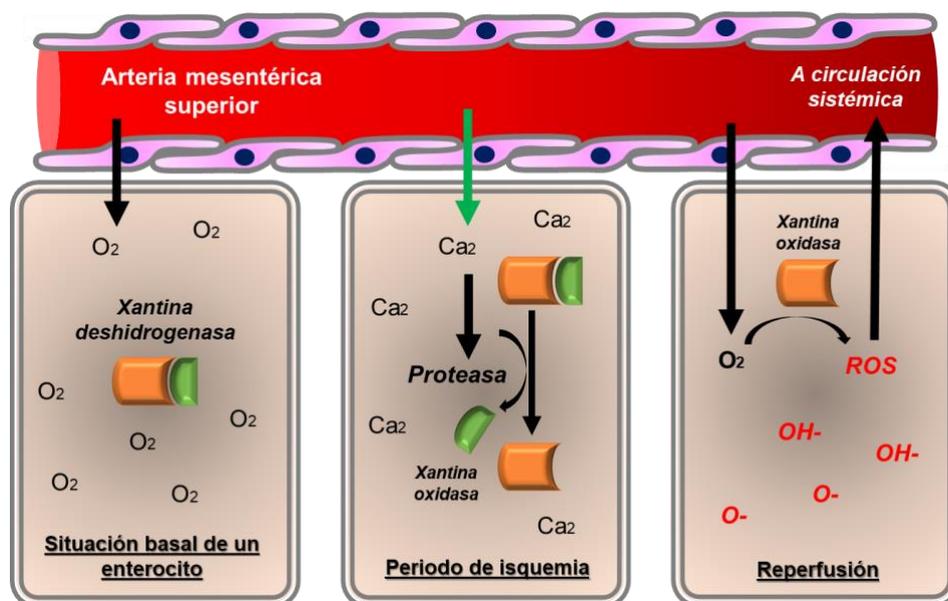
### **1.5.1. Mecanismos para la restauración del flujo sanguíneo**

Las vísceras emplean en reposo solamente el 20% de los capilares para su oxigenación (8); aun y todo, esto no quita que en periodos prolongados de compromiso del flujo sanguíneo no se puedan dar daños irreversibles al parénquima intestinal. Una reducción del flujo sanguíneo intestinal da como resultado la liberación de metabolitos vasodilatadores en respuesta al estímulo de la hipoxia: adenosina, CO<sub>2</sub>... Pese a ello, el flujo sanguíneo puede reducirse hasta un 20% con respecto a su riego basal en circunstancias de hipovolemia grave.

### **1.5.2. Efectos de la isquemia sobre el metabolismo del enterocito**

En la aparición de las lesiones intestinales, como en cualquier tipo de isquemia, las especies reactivas del oxígeno o ROS (del inglés: reactive oxygen species) tienen un papel fundamental durante la reperfusión.

La **figura 2** representa el proceso de formación de radicales libres en el contexto de la isquemia-reperfusión. La xantina deshidrogenasa es un enzima involucrado en el metabolismo de las purinas. Cuando existe una privación de O<sub>2</sub> al enterocito, la alta permeabilidad al calcio activa una proteasa que convierte la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, enzima con las mismas características que la anterior, pero con alta capacidad de formación de radicales libres de oxígeno. La restauración del flujo sanguíneo provoca la formación de radicales libres por parte del enzima. Esos radicales libres son vertidos al torrente sanguíneo, y por lo tanto distribuidos por el organismo, provocando daños no solo a nivel local (intestinal) sino también a nivel sistémico.



**Figura 2.** Representación gráfica de los cambios enzimáticos del enterocito desde la instauración de la isquemia hasta el periodo de reperfusión. Imagen modificada de Sisinio de Castro. Manual de Patología General (9).

### 1.5.3. Consecuencias de la liberación de ROS

La primera consecuencia de la liberación de ROS al torrente sanguíneo es el proceso de peroxidación lipídica (8). La peroxidación de lípidos suele darse en condiciones fisiológicas, aunque aumenta considerablemente en situaciones de estrés oxidativo como es en este caso.

Una consecuencia directa de esta peroxidación lipídica es la formación de epítomos específicos de oxidación (OSE). El proceso de formación de estos epítomos comienza, por ejemplo, con la fosfatidilcolina. Esta contiene un ácido graso poliinsaturado particularmente vulnerable a la oxidación, el cual da como resultado especies altamente reactivas (como el malonilaldehído). Este aldehído (entre otros), puede generar enlaces covalentes entre aminas primarias de proteínas o grupos amino de fosfolípidos, y, por ende, generar OSEs. Estos epítomos son necesarios para el reconocimiento por patrones asociados al daño celular (DAMP), permitiendo al organismo promover la remoción de células dañadas o moléculas oxidadas.

De esta forma, los DAMP son reconocidos por células presentadoras de antígeno, mediante receptores tales como los receptores tipo Toll (TLR), receptores tipo Nod (NLR) etc. Estos activan vías de señalización proinflamatorias (como la vía del NF-

$\kappa$ B o la vía de las MAPK). De esta forma, la respuesta del sistema inmune para promover la reparación de las células dañadas por los radicales libres termina provocando un efecto deletéreo sobre el organismo, este conjunto de respuestas inflamatorias asociadas al estrés oxidativo recibe el nombre de “ferroptosis” (10).

#### **1.5.4. Activación de los procesos inflamatorios agudos durante el periodo de reperfusión**

##### 1.5.4.1. Las células polimorfonucleares

Tras un periodo de isquemia intensa, al reperfundir el intestino, la sangre transporta al foco del daño células de la inmunidad innata, particularmente neutrófilos y macrófagos. Esto se debe a que el daño producido por la isquemia conduce a una pérdida de la barrera epitelial, exponiéndolo al tejido subendotelial y así estimula la producción de moléculas como la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1). Esta molécula induce al secuestro de neutrófilos en el tejido dañado, produciendo estos, a su vez, moléculas proinflamatorias como las especies reactivas de oxígeno (por activación de la mieloperoxidasa) y la activación de la vía del complemento, que, a su vez conduce a la activación de moléculas mediadoras de la inflamación, tales como la IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  (11).

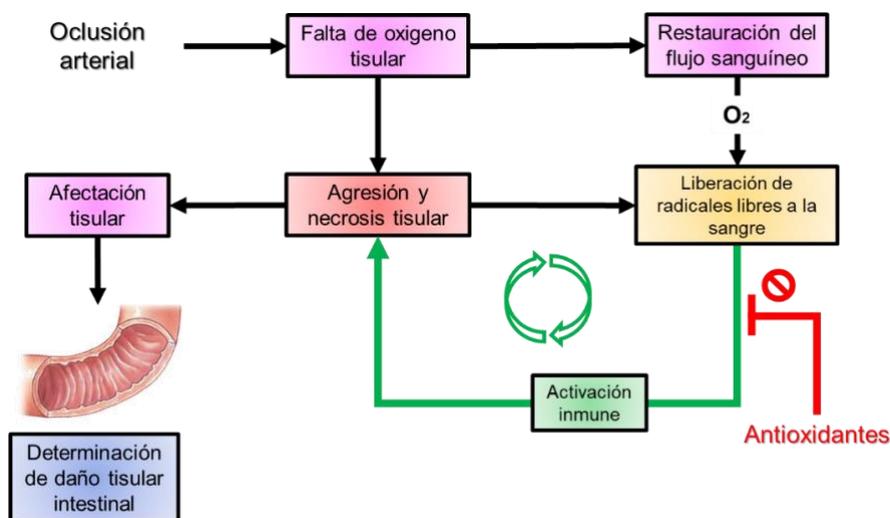
##### 1.5.4.2. Moléculas proinflamatorias

Las células involucradas en la defensa inmune primaria, tales como los macrófagos, se activan en situaciones proinflamatorias secretando moléculas como la interleukina-1, el factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o la interleukina-6. Esto se ha podido observar al intentar bloquear citoquinas con antagonistas de la IL-1 como el Anakinra, logrando reducir tanto el daño intestinal como la concentración de las moléculas anteriormente descritas (12).

#### **1.5.5. Efectos a nivel sistémico**

Tanto las moléculas modificadas por los ROS, como los mediadores proinflamatorios y los neutrófilos activados localmente durante la reperfusión, al diseminarse por el torrente sanguíneo extienden el daño a otros territorios. El daño es más evidente en aquellos órganos más ricos en células endoteliales, ya que éstas son las principales dianas de las especies reactivas del oxígeno y de los neutrófilos activados. Por ello,

desde un punto de vista clínico, la reperfusión del intestino isquémico puede seguirse de un fallo multiorgánico: hígado, riñón, pulmón.



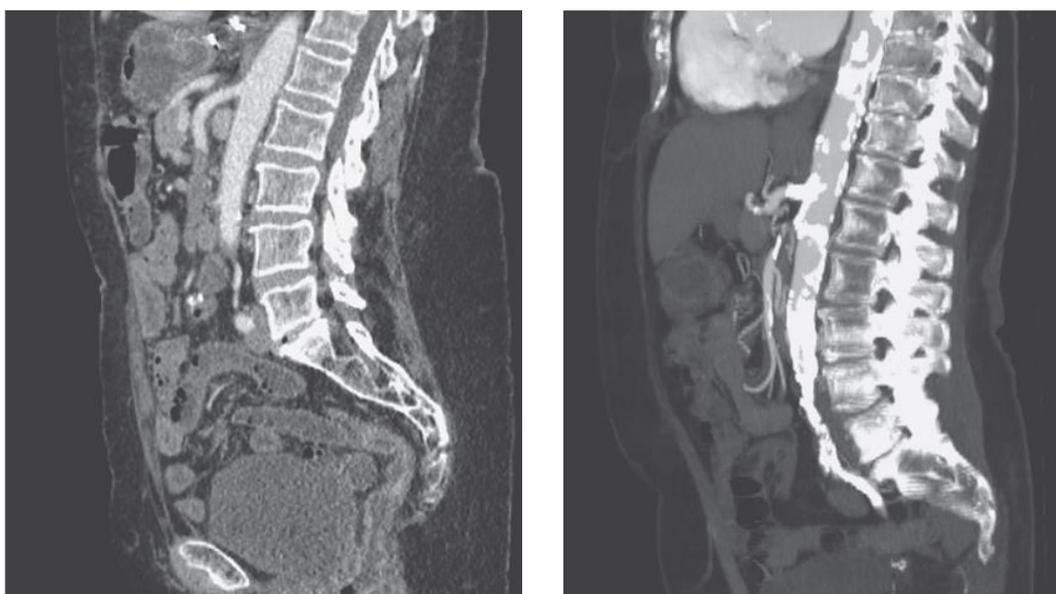
**Figura 3. Esquema del proceso fisiopatológico de la isquemia-reperfusión.** La falta de oxígeno derivada de una oclusión arterial aguda conduce a una agresión y necrosis celular directa. Sin embargo, la restauración del flujo sanguíneo activa procesos inmunitarios deletéreos para el propio tejido debido a la liberación de radicales libres, que activan el sistema inmune.

La activación del sistema inmune producido por el daño y la necrosis intestinal, paradójicamente, acaba provocando un efecto multiplicador sobre el daño, no solo a nivel local, sino también a nivel sistémico. De tal forma, que los antioxidantes juegan un papel fundamental en la neutralización de aquellos elementos que promuevan y multipliquen la activación del sistema inmune innato, y con ello, el daño al organismo (figura 3).

## 1.6. DIAGNÓSTICO

Es fundamental tener presente que hay que sospechar un cuadro de isquemia mesentérica aguda en las siguientes situaciones: personas >50 años, con factores de riesgo y clínica de abdomen agudo de instauración súbita.

Tras los síntomas cardinales (aunque no específicos), las pruebas de imagen elementales para su detección son la angiotomografía (angio-TAC), tal y como se muestra en la **figura 4**, y, con fines diagnósticos y terapéuticos, la arteriografía (2).



**Figura 4. Angio-TAC de un paciente afectado por un embolo en la arteria mesentérica superior.** En la imagen de la derecha se puede observar como el contraste intravenoso se detiene abruptamente al inicio de la AMS. En la imagen de la derecha se puede observar cómo, tras el tratamiento endovascular, regresa la permeabilidad a la arteria (el foco hiperintenso corresponde al stent implantado). Extraído de Daniel G. Clair et al., 2016.

## 1.7. TRATAMIENTO

### 1.7.1. Tratamiento inicial

El tratamiento inicial ha de ser precoz y enérgico resumido en la **tabla 1** como “las cuatro R del manejo de la isquemia mesentérica” (13). En cuanto al tratamiento médico, ha de comenzarse aportando soluciones cristaloides, introducir una sonda nasogástrica por el íleo adinámico acompañante, anticoagulación con heparina y administración de antibioticoterapia de amplio espectro por riesgo de peritonitis por translocación bacteriana (14). Además de todo lo anterior, debe solicitarse una intervención quirúrgica urgente en caso de peritonismo incipiente.

**Tabla 1. Las cuatro “R” del tratamiento de la isquemia mesentérica aguda.** Savlania et al., 2017.

Resucitación	Reanimación con fluidos para restaurar la perfusión intestinal
Diagnóstico rápido (Rapid diagnosis)	Alta sospecha clínica inicial, angio-TAC urgente
Revascularización temprana	Técnicas de cirugía abierta, endovascular
Reevaluación	Laparotomía en segundo tiempo, para evaluar los segmentos intestinales inviables

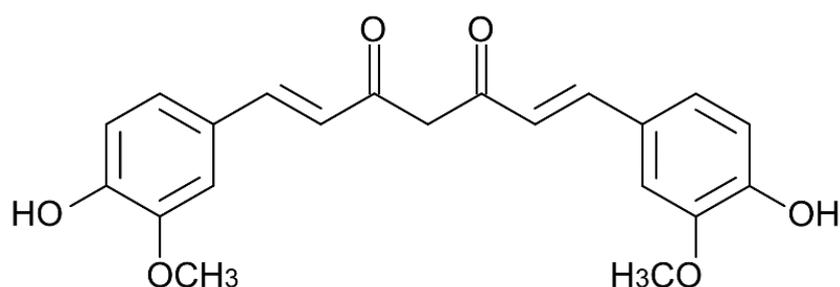
### 1.7.2. Tratamiento específico. Técnicas.

El embolismo de la arteria mesentérica superior conlleva una rápida progresión a la necrosis del intestino delgado. Debido a esto, la revascularización debe hacerse sin demora. Para ello, hoy en día existen diversas técnicas de revascularización, existiendo dos principales: la embolectomía abierta (cirugía convencional) y la cirugía endovascular mediante técnicas de radiología intervencionista. No existe un amplio consenso en si debe emplearse una técnica u otra, ya que para ello hay que tener en cuenta la duración y la severidad de la isquemia, la etiología de la lesión oclusiva e incluso la disponibilidad de radiología intervencionista en el mismo centro hospitalario (15).

## 1.8. FÁRMACOS EXPERIMENTALES

### 1.8.1. Curcumina

La curcumina, cuya denominación química es diferuloimetano (**figura 5**), se extrae del rizoma de la planta *Curcuma longa* (16). Tiene aspecto de polvo amarillo-anaranjado y es prácticamente insoluble en agua (17). Debido a ello, para su administración debe disolverse en un compuesto lipídico (como el aceite de sésamo) que permita su absorción entérica y asegure su adecuada biodisponibilidad (18).



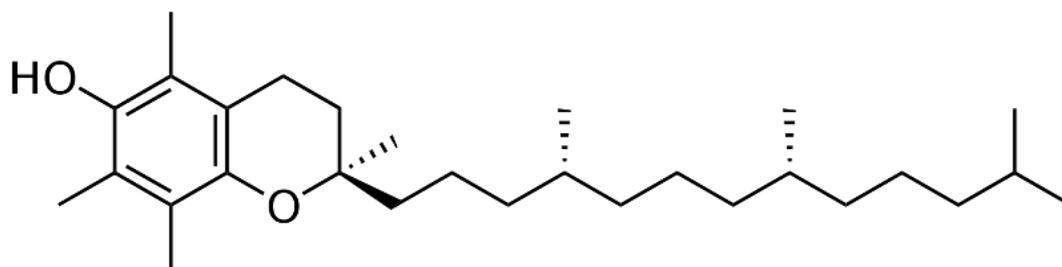
**Figura 5. Estructura molecular de la curcumina en su forma *ceto*.** La molécula está conformada por dos grupos arilo en sus extremos, conectados por un grupo heptano lineal. Nombre IUPAC: (1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-diona).

El extracto de la cúrcuma ha sido muy utilizado en la India desde hace por lo menos cinco milenios tanto para darle color a los alimentos como para tratar diversos padecimientos (19). Se ha reportado su uso en un amplio abanico de enfermedades como la diabetes, el cáncer o las enfermedades cardiovasculares (16,20,21). Además

de todo ello, se ha propuesto que la curcumina tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes que podrían ponerse de manifiesto en modelos experimentales de isquemia intestinal (22–24).

### 1.8.2. $\alpha$ -tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol es una forma de vitamina E (**figura 6**). La vitamina E es un compuesto vitamínico liposoluble que juega un papel fundamental en la prevención de la oxidación de las membranas celulares (25). No se sintetiza en el organismo, adquiriéndose a través de la dieta. Se incorpora a los quilomicrones y las VLDL junto con los lípidos restantes y, después de atravesar el sistema linfático e incorporarse a la circulación venosa sistémica, la vitamina E (en forma de  $\alpha$ -tocoferol) es transportada al hígado para ser secretada de nuevo junto a las VLDL (26).

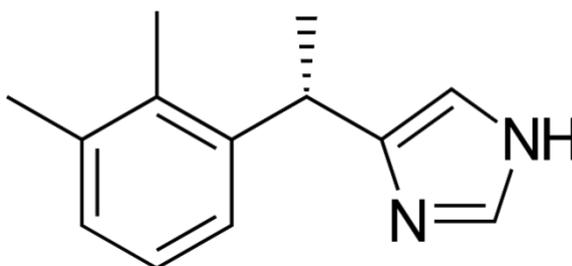


**Figura 6. Estructura molecular del  $\alpha$ -tocoferol.** Compuesta por un compuesto heterocíclico denominado cromano unido a una cadena polipropenoide saturada. Nombre IUPAC: (2R)-2,5,7,8-Tetramethyl-2-[(4R,8R)-(4,8,12-trimethyltridecyl)]chroman-6-ol.

Se han observado múltiples efectos beneficiosos del  $\alpha$ -tocoferol en el organismo. Entre otros, un efecto antiinflamatorio, ya que protege a las membranas lipídicas de su oxidación por parte de los ROS, y un efecto antiagregante e inmunomodulador mediante la disminución de los niveles de prostaglandina E2 (27). El  $\alpha$ -tocoferol ha sido empleado, además, en múltiples estudios para la evaluación de la mitigación del daño en modelos de isquemia-reperfusión esplácnica (28–30). Aunque el déficit de vitamina E es inusual, se ha observado que en pacientes con síndromes malabsortivos, tales como la abetalipoproteinemia, el déficit de dicha vitamina puede ocasionar trastornos neurológicos y visuales como la ataxia y retinopatía, respectivamente (31).

### 1.8.3. Dexmedetomidina

La dexmedetomidina es un agonista selectivo  $\alpha$ -2 usado ampliamente como sedante en las unidades de cuidados intensivos (**figura 7**). Carece de riesgo de depresión cardiorrespiratoria, además de poseer un efecto protector frente al delirio y la agitación (32). No se tiene mucha certeza del origen del efecto protector de la dexmedetomidina frente al estrés oxidativo, observándose diversos mecanismos como la activación de las células H9C2 (33), mediante la activación de la vía de señalización Nrf-2/HO-1 (34). Posee una alta biodisponibilidad en administración subcutánea. En un ensayo clínico aleatorizado se observó que la dexmedetomidina administrada por vía subcutánea alcanza concentraciones máximas en plasma a los 15 minutos de su administración, manteniéndose su efecto sedante durante las 4 horas siguientes (35).



**Figura 7. Estructura molecular de la dexmedetomidina hidrocloreuro.** Conformada por un grupo imidazólico y un grupo fenilo unidos mediante un esqueleto carbonado. Nombre IUPAC: 5-[(1S)-1-(2,3-dimethylphenyl)ethyl]-1H-imidazole.

Su efecto protector frente al daño inducido por la isquemia-reperfusión ha sido probado en múltiples modelos murinos de isquemia intestinal, logrando reducir el daño en el propio tejido intestinal (36–38), y en tejidos extraintestinales como el tejido hepático (39) e incluso en el tejido pulmonar (40,41).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. HIPÓTESIS**

El proceso de isquemia intestinal debido a un embolismo de la arteria mesentérica superior provoca cambios agudos en el tejido intestinal debido al infarto: la carencia de oxígeno conduce a un aumento considerable de la permeabilidad al calcio, causante de la activación de una proteasa que convierte la xantina deshidrogenasa en su versión menos eficiente, xantina oxidasa.

Al desobstruir la arteria y, consecuentemente, reperfundir el tejido intestinal, la enzima xantina oxidasa genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que son vertidos al torrente sanguíneo, generando epítomos específicos de oxidación. Estos epítomos activan al sistema inmune, generando una respuesta inmune sistémica y descontrolada que, en casos severos, puede conducir a un fallo multiorgánico, y consecuentemente, la muerte. En cuanto al intestino, el daño producido por la isquemia suele conducir a la desestructuración de sus vellosidades, y en casos severos, la desintegración total de las mismas. Esta alteración sobre la mucosa intestinal puede conducir a sangrado, pérdida de electrolitos e incluso traslocación bacteriana que conduzca a una sepsis de origen intestinal.

Mediante el empleo de compuestos farmacológicos con actividad antioxidante previamente descritos (como la curcumina, el  $\alpha$ -tocoferol o la dexmedetomidina) se podrían neutralizar dichas especies reactivas de oxígeno, minimizando la formación de epítomos específicos de oxidación, reduciendo el daño ocasionado por el cuadro de isquemia-reperusión.

### **2.2. OBJETIVOS**

Los objetivos de este proyecto de investigación son, por tanto:

1. Aplicar una valoración cualitativa de los daños en el tejido intestinal por isquemia-reperusión mediante el análisis anatomopatológico por H&E.
2. Valorar si el daño de la mucosa intestinal se traduce en una alteración de la capacidad absortiva valorable mediante la prueba de la D-Xilosa.
3. Valorar si los daños sistémicos producidos por la isquemia-reperusión se

traducen en alteraciones de los niveles séricos de parámetros analíticos como la urea, creatinina, Creatinquinasa, LDH, GOT-AST y GLT-ALT.

4. Analizar el potencial de diferentes fármacos para poder atenuar el daño producido por proceso isquémico valorando los parámetros descritos en los tres objetivos precedentes.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Animales

Para el presente trabajo se emplearon ratas singénicas WAG/RijHsd (*Rattus norvegicus*) hembras, con unas características homogéneas de edad y peso (adultos jóvenes de unos 3-4 meses de edad y una media de 170gr, respectivamente).

La cepa fue adquirida a la empresa Harlan Sprague Dawley Inc. (Países Bajos) por el Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física y expandida en el Animalario de la UPV/EHU. Los animales fueron alojados en jaulas, con un máximo de cuatro animales por cada una, a temperatura controlada de 24°C, con libre acceso a comida (Panlab A-04) y agua, y con un ritmo de luz-oscuridad de 12 h. El procedimiento experimental ha recibido la aprobación del Comité de Ética Experimental de la UPV/EHU (M20\_2021\_012, M30\_2021\_013).

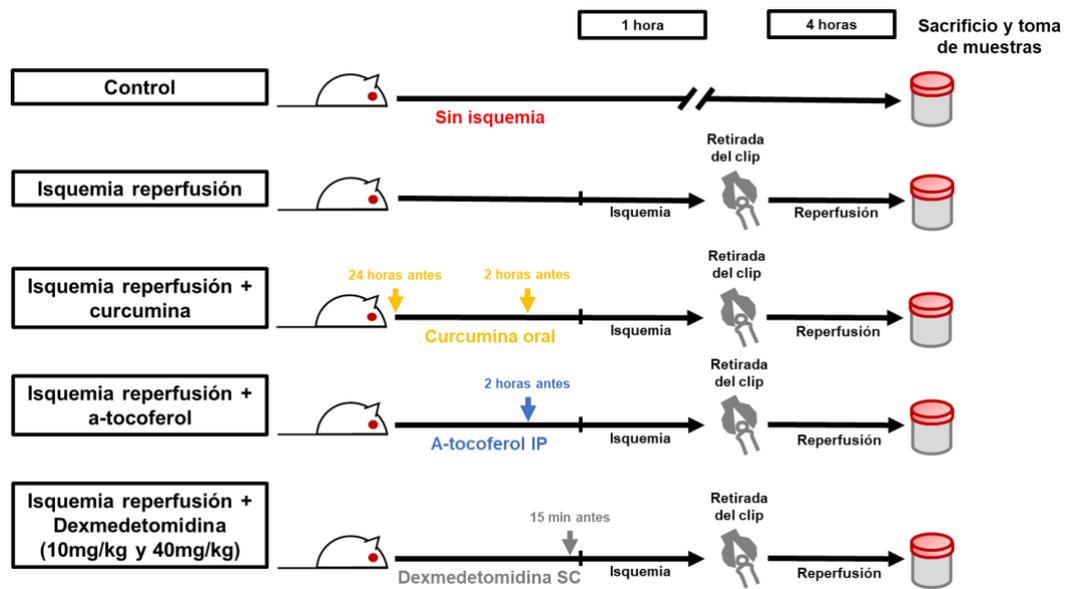
Para llevar a cabo el trabajo se emplearon un total de 77 ratas distribuidas aleatoriamente a los diferentes grupos experimentales (**figura 8**):

- 6 para fijar los valores de referencia de una analítica sanguínea normal (grupo no dañado, control).
- 6 para definir el daño tanto a nivel anatomopatológico como a nivel bioquímico tras una hora de isquemia y cuatro horas de ulterior reperusión, sin tratamiento.
- 24 para definir el daño, tanto a nivel anatomopatológico como a nivel bioquímico tras una hora de isquemia y cuatro horas de ulterior reperusión, junto con la administración del tratamiento experimental, de las cuales:
  - 6 recibieron dos dosis de curcumina por vía oral, 24 horas y dos horas antes del procedimiento quirúrgico, respectivamente, para asegurar niveles séricos suficientes de curcumina.
  - 6 recibieron  $\alpha$ -tocoferol, administrando una dosis única por vía intraperitoneal 2 horas antes de inducir la isquemia.
  - 12 recibieron dexmedetomidina, 6 de ellas 10mg/kg (dosis baja) y las otras 6 a 40mg/kg (dosis alta) administrando una dosis única por vía

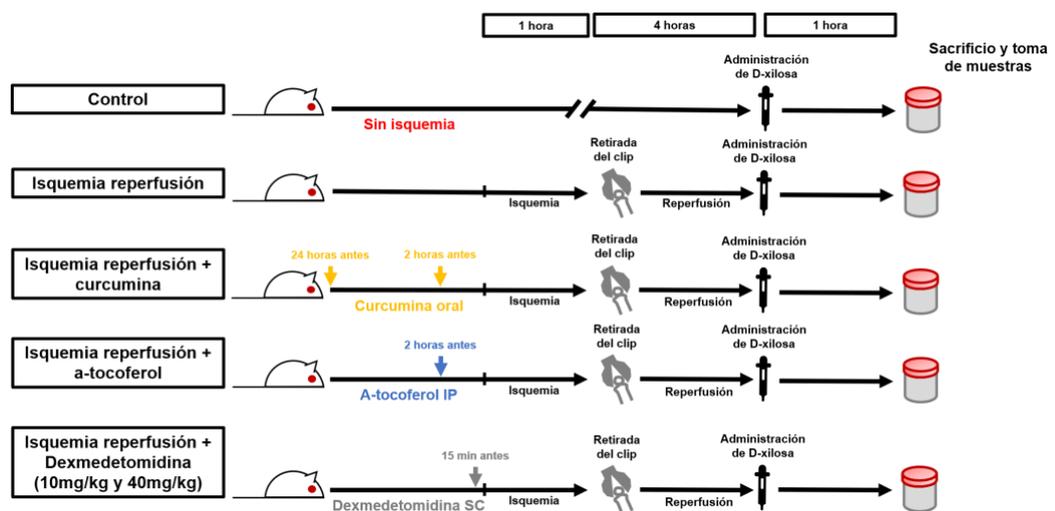
intraperitoneal 15 minutos antes de la isquemia.

- 5 animales fueron retirados del estudio por problemas acaecidos durante el experimento. 4 por alta sospecha de pérdida de la isquemia durante el proceso y 1 por fallecimiento (probablemente como complicación de la anestesia).
- Para la realización de la prueba de d-xilosa se emplearon 36 animales, distribuidos en números iguales a los anteriores (6 por cada grupo).

A



B



**Figura 8. Representación esquemática del proceso experimental.** Cada fila representa los grupos empleados. En el A, los grupos sin la prueba de la D-xilosa. En la B se incluye el proceso de la prueba de la D-xilosa.

### 3.1.2. Fármacos

#### 3.1.2.1. Isoflurano

Para la inducción y el mantenimiento de la anestesia se utilizó isoflurano en su forma comercial Aerrane<sup>®</sup> (Baxter, S.L.); envase de 250ml de isoflurano 100% en forma de líquido para inhalación de vapor. Se empleó una concentración del 3% para la inducción, y un 1% para el mantenimiento de la anestesia.

El isoflurano es un líquido volátil y no-inflamable, compuesto molecularmente por un enlace de éter halogenado, ampliamente utilizado para la inducción y el mantenimiento de la anestesia general (42–44). Se usa habitualmente en concentraciones que varían en un rango del 1,5-3%. Aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud, se piensa que actúa en la membrana lipídica neuronal, generando una disrupción en la transmisión neuronal (45). Además, se conoce que tiene un papel importante en la estimulación de canales ionotropos regulados por neurotransmisores inhibitorios tales como el ácido gamma aminobutírico (IGABA) o glicina (42,43), o en la inhibición de canales regulados por N-metil-D-aspartato (NMDA) (42). Prácticamente la totalidad del isoflurano es eliminado por el pulmón sin sufrir cambios.

#### 3.1.2.2. Óxido nitroso (NO<sub>2</sub>)

Para reforzar el efecto anestésico del isoflurano los animales se ventilaron con una mezcla de oxígeno (1/3) y óxido nitroso (2/3) a un flujo constante de 0,5 L/min y 1 L/min, respectivamente, tanto durante la inducción como durante el mantenimiento. El óxido nitroso estaba conservado en formato licuado (98% v/v), en cilindros de acero criogénicos inmóviles (Linde plc).

Es un gas inodoro e incoloro a temperatura ambiente. Es muy empleado para la anestesia general por sus propiedades anestésicas y analgésicas, ya que permite disminuir las dosis de anestésicos generales al tener un efecto aditivo (46).

#### 3.1.2.3. Curcumina

El formato comercial empleado ha sido curcumina en polvo (C1386-5G; MERCK). En el trabajo se administró una dosis de 200 mg/kg de curcumina en solución coloidal por vía oral (40 mg/ml). Para ello, se mezclaron 200 mg de curcumina con 5 ml de aceite de sésamo puro, y se dejó la solución coloidal en un agitador magnético

calectado a 60°C y a 900 rpm durante una hora, previo a la administración del compuesto.

#### 3.1.2.4. $\alpha$ -tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol se obtuvo del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Basurto (Bilbao), preparado en ampollas de solución inyectable 5 mg/ml. Siguiendo trabajos realizados previamente en el Laboratorio de Cirugía Experimental se administraron 20 mg/kg de  $\alpha$ -tocoferol en forma de bolus por vía intraperitoneal, dos horas antes de inducir la isquemia intestinal (47).

#### 3.1.2.5. Dexmedetomidina hidrocloreuro

La dexmedetomidina (Dexdor® 100µg/ml) fue suministrado por el Servicio de Anestesiología y Reanimación del Hospital Universitario Basurto (Bilbao). Se administró en dos grupos, recibiendo uno de ellos 10mg/kg (dosis baja) y el otro 40mg/kg (dosis alta) por vía subcutánea 15 minutos antes de la instauración isquemia.

## 3.2. MÉTODOS

El experimento tiene como objetivo analizar los posibles daños del intestino, tanto fisiopatológicos como estructurales, como resultado de la anulación durante una hora del flujo en la arteria mesentérica superior, seguida de una reperfusión de cuatro horas. Para ello se han realizado estudios anatomopatológicos y de enzimas sanguíneos.

### 3.2.1. Inducción de la anestesia

El animal se introdujo en una cámara cerrada y transparente, ventilada con una mezcla de oxígeno y óxido nitroso y un 3% de isoflurano. Una vez anestesiado al animal, se extrajo de la cámara y se colocó en decúbito supino con el hocico introducido en un tubo aireado con idéntica mezcla de gases, pero tan sólo un 1% de isoflurano.

### 3.2.2. Procedimiento quirúrgico

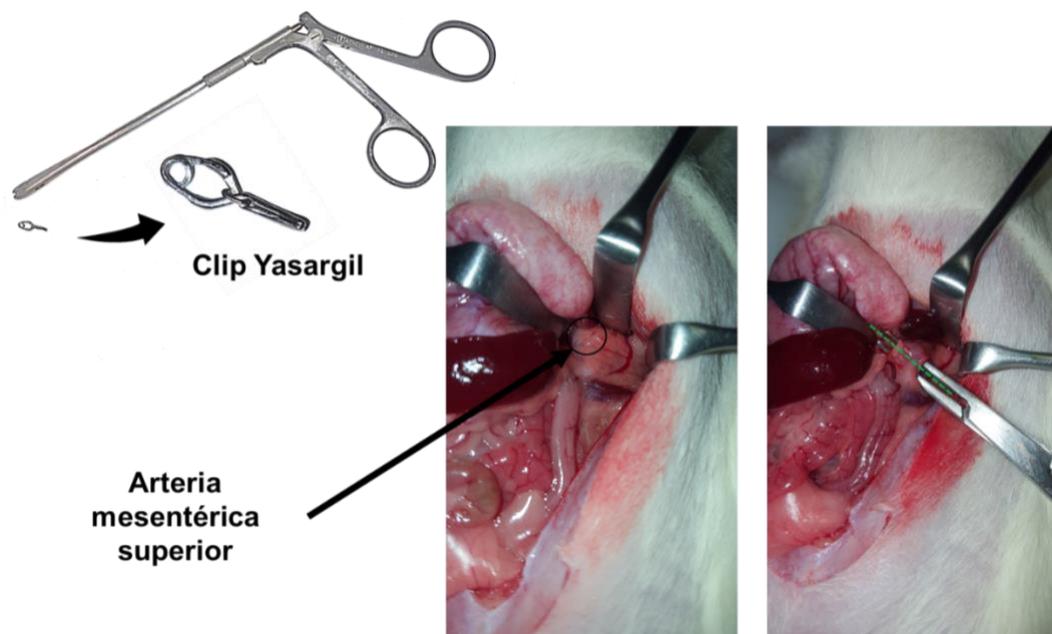
#### 3.2.2.1. Inducción de la isquemia

Para la cirugía, al animal se colocó en decúbito supino, se rasuró el campo quirúrgico con una afeitadora eléctrica y se aplicó una solución alcohólica con el fin de desinfectar la zona. Una vez preparado el animal, se le practicó una laparotomía media (incisión longitudinal de 4 cm en dirección caudo-cefálica). Al abrir la cavidad abdominal, se

separaron los elementos viscerales con el fin de diseccionar la arteria mesentérica superior, entre ellos el intestino grueso y delgado, el estómago y el bazo. El paquete visceral se cubrió con una gasa hidrófila impregnada en suero fisiológico con el fin de protegerlo del ambiente exterior.

La raíz de la arteria mesentérica superior se encuentra en una localización anatómica retroperitoneal izquierda, que delimitado por unos límites de conformación triangular: pedículos renal y suprarrenal, y aorta. Una vez localizado el vaso, se disecó con una pinza de tipo mosquito (**figura 9**).

Para la oclusión de la arteria mesentérica superior y el mantenimiento de la isquemia de todo su territorio irrigado, se le aplicó un clip atraumático vascular YASARGIL® (FE681K; Æsculap, Center Valley, PA, USA). Para asegurarse la correcta oclusión arterial, se observó si había una ausencia de pulsos distales a la arteria.



**Figura 9. Relaciones anatómicas de la arteria mesentérica superior en la rata.** Para una adecuada disección del vaso sanguíneo, se tomó como referencia el triángulo conformado por la vena renal, la aorta y la vena suprarrenal. Mediante una pinza mosquito, se disecó la arteria, y se clampó mediante un clip yasargil.

Al término de la intervención se cerró la incisión mediante sutura continua en dos planos: El plano muscular y seroso, mediante hilo sintético no absorbible 4/0; y el plano cutáneo, mediante hilo de seda trenzada 3/0.

#### 3.2.2.2. Reperusión

Tras una hora de isquemia, se volvió a anestésiar al animal mediante la técnica descrita anteriormente, y se retiró el clip vascular de la arteria mesentérica superior. Al retirar el clip, regresaron los pulsos distales a la oclusión y los tejidos adquirieron un color rojo vivo debido a la inmediata reperusión. Se le volvió a realizar una sutura en dos planos quirúrgicos y se le dejó las cuatro horas siguientes en el estabulario correspondiente.

#### 3.2.2.3. Sacrificio

Tras cuatro horas de reperusión, se procedió a la recogida de muestras. Para ello, se volvió a anestésiar al animal y se reabrió la laparotomía. Para la extracción sanguínea, se puncionó la vena cava inferior mediante una aguja hipodérmica (Abocath® 23G) y se extrajo aproximadamente 4 ml de sangre venosa. Para la recogida de tejido intestinal, se disecó la parte distal del íleon (que conecta con el ciego), se le desproveyó el mesenterio para no enrollarse sobre sí y se seccionaron cuatro muestras de 1/2 centímetro cada una (aproximadamente), guardándolas en un frasco con formaldehído al 4% p/v (252931; Panreac Química S.L.U., España).

Tras el proceso, se sacrificó al animal mediante la técnica de dislocación cervical. Una vez fue asegurada la efectiva defunción del animal (ausencia de latido y de signos respiratorios), se dispuso el cadáver al animalario de la UPV/EHU para la adecuada eliminación de residuos biológicos según la normativa vigente.

### **3.2.3. Histología**

#### 3.2.3.1. Inclusión en parafina

El propósito de este proceso es intercambiar el agua presente en los tejidos por parafina sólida, preservando la integridad estructural de los tejidos. Teniendo en cuenta que la parafina líquida no es miscible en agua, hay que lograr que, tanto en el espacio extracelular como en el intracelular, el agua sea sustituida por etanol, un compuesto que sí lo es en agua. Sin embargo, el etanol tampoco es miscible en parafina líquida, por lo que hay que sustituirlo por un disolvente orgánico que, sí lo sea con ambos: citrosol (253139; Panreac Química S.L.U., Barcelona).

El primer paso es embeber el tejido un mínimo de 24 horas en formaldehído al 4% p/v.

El proceso se realizó automáticamente mediante el procesador de tejidos Citadel 2000 (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). Los pasos efectuados se detallan a continuación:

- I. 3 x 60 min. etanol 90°
- II. 3 x 60 min. etanol 100°
- III. 3 x 60 min. citrosol
- IV. 2 x 60 min. parafina líquida 60°C

Después de este proceso hay que encastrar los tejidos en un bloque de parafina. El proceso es el mismo para cada muestra: se llena parcialmente un molde con parafina líquida y se introducen los tejidos de la muestra, con el eje longitudinal del intestino perpendicular a la dirección del corte del microtomo (para conseguir un corte transversal del intestino delgado). Después, se rellena el volumen restante de parafina líquida, se le coloca encima el casete de plástico y se deja solidificar en la placa fría. Al solidificar, se separan los bloques de los moldes correspondientes y se guardan hasta ser cortados.

#### 3.2.3.2. Cortes histológicos

Se realizaron cortes histológicos de 4µm de espesor con el microtomo. Para ello, se dejaron los bloques de parafina en una placa fría con el propósito de endurecer la cera, y así facilitar el corte por la cuchilla. Una vez obtenidos los cortes, se dejaron en un baño de agua destilada a 40°C para que se extendieran y no quedasen pliegues. Por último, se recogieron los cortes con un portaobjetos y se dejaron secar 24 horas en una estufa a 30°C. Los portaobjetos fueron rotulados con lápiz para identificarlos correctamente.

#### 3.2.3.3. Tinción

Para la visualización microscópica de los cortes histológicos se empleó una tinción de Hematoxilina-Eosina. La técnica se hizo con un aparato de tinción automático (Shandon Linear Stainer GLX360-2; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). La secuencia de tinción llevada se detalla en la **tabla 2**.

**Tabla 2. Protocolo para la tinción con hematoxilina y eosina.** Protocolo extraído del Laboratorio de Cirugía Experimental del Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física de la UPV/EHU.

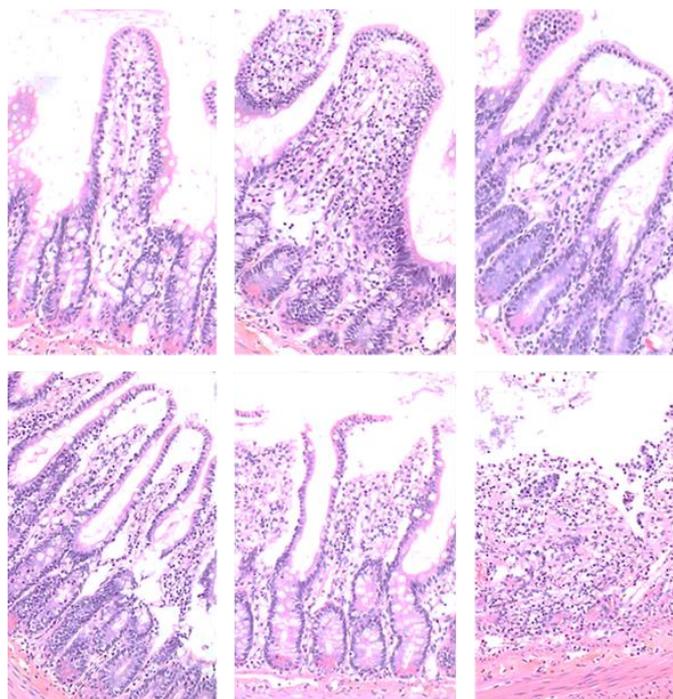
1	1' estufa a 60°C	8	1 x 30" agua corriente
2	4 x 30" citrosol	9	2 x 30" Shandon blueing reagent
3	2 x 30" etanol 100°	10	1 x 30" etanol 90°
4	2 x 30" etanol 90°	11	1 x 30" Eosina Y
5	4 x 30" hematoxilina Harris	12	3 x 30" etanol 90°
6	1 x 30" agua corriente	13	2 x 30" etanol 100°
7	1 x 30" alcohol ácido (1% v/v HCl)	14	2 x 30" citrosol

#### 3.2.3.4. Valoración anatomopatológica

Para la valoración anatomopatológica del daño producido en la mucosa intestinal, se empleó una escala numérica descrita por Chiu et al. (48). La escala valora el daño histológico de las vellosidades intestinales de la mucosa del íleon terminal en un rango del 0 al 5 (**Tabla 3**). La **figura 10** representa mediante imágenes al microscopio cada nivel de lesión.

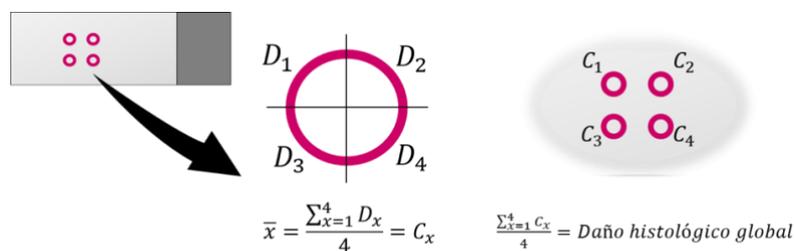
**Tabla 3. Escala de Chiu.** Los valores numéricos indican el grado de daño (de menor daño a mayor daño).

0	Vellosidades normales
1	Desarrollo de espacio apical subepitelial de Gruenhagen
2	Moderado aumento del espacio subepitelial con desprendimiento importante de las células epiteliales de la lámina propia
3	Separación masiva entre epitelio y lamina propia, ligero desnudamiento epitelial
4	Desnudamiento epitelial con exposición lamina propia
5	Desintegración del epitelio y lamina propia, necrosis de la vellosidad con úlcera



**Figura 10. Grados de daño histológico en imágenes microscópicas.** De izquierda a derecha, de arriba abajo se numeran los grados de daño del 0 al 5.

El proceso de valoración cuantitativa del daño histológico se hizo de la siguiente manera: se realizaron cuatro cortes transversales del intestino delgado por animal en forma de O. Cada corte se dividió en cuatro cuadrantes. En cada cuadrante, se valoró el daño medio en una escala numérica del 0 al 5 descrita anteriormente, y después se calculó la media aritmética de los cuadrantes totales de ese corte. Por último, se calculó la media aritmética de los cuatro cortes y se obtuvo el daño global de cada animal (**figura 11**).



**Figura 11. Método de cálculo empleado para la determinación numérica del daño histológico.** Se toman 4 cortes transversales de intestino por cada animal. Después, cada corte se divide en cuatro cuadrantes, y se mide el daño usando la media aritmética del daño de los cuatro cuadrantes. Por último, se calcula la media aritmética de los resultados de cada corte, para obtener el daño histológico global de cada animal.

#### 4.2.3.5. Valoración bioquímica

El análisis bioquímico de las muestras serológicas lo realizó Laboratorios Axpe. Se han analizado 6 parámetros: GOT-AST, GPT-ALT, creatinina, urea, creatinquinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH). La **tabla 4** muestra algunos de los valores bioquímicos normales.

**Tabla 4. Valores serológicos normales en una rata de la especie *Rattus norvegicus* de entre 3 y 18 meses.**  
Extraído de Houtmeyers et al., 2016. (49)

Variable	Límite inferior	Límite Superior
Urea nitrógeno (mmol/L)	2.5 [2.0–2.6]	6.6 [6.0–7.1]
Creatinina ( $\mu\text{mol/L}$ )	ic [ $< 18$ to $< 18$ ]	53 [46–62]
ALP (U/L)	40 [37–55]	442 [386–477]
ALT (U/L)	22 [20–24]	137 [102–219]

#### 3.2.4. Estudio funcional del intestino mediante la prueba de la D-Xilosa

La D-Xilosa es un monosacárido derivado de la hemicelulosa. Su absorción está directamente correlacionada con la integridad del tubo digestivo, estando disminuido en situaciones de daño intestinal, siendo, por tanto, una prueba sencilla y útil para valorar el grado de lesión intestinal.

Para valorar la capacidad absorbente del intestino se empleó la prueba de la d-xilosa. Esta prueba consiste en administrar una solución de 2mg/kg por vía oral mediante una sonda nasogástrica y valorar su concentración sanguínea al cabo de 1 hora. Una vez extraída la sangre mediante un tubo sin aditivos, se centrifuga a 3000rpm durante 10 minutos. Una vez concluido el proceso de centrifugación, se añaden 30 $\mu\text{L}$  de suero a una probeta con 2mL de cromógeno. El compuesto resultante se hierve durante 4 minutos (tornándose de color morado) y se deja enfriar durante 20 minutos en un lugar guardado de la luz. Después, se mide la absorbancia del compuesto a 554 nm.

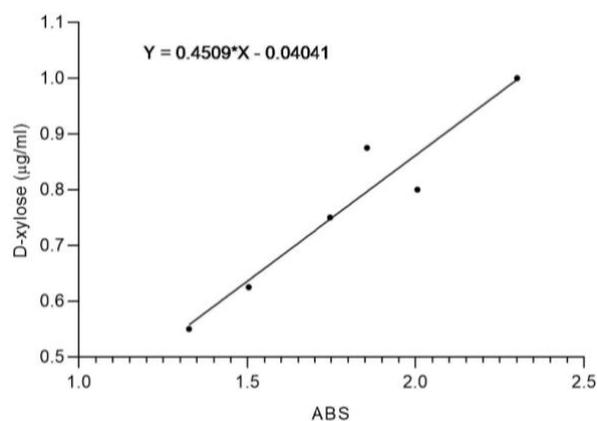
Para extrapolar de las Unidades de Absorbancia a su equivalencia en  $\mu\text{g/ml}$  se ha realizado un estudio de regresión lineal que nos permite calcular la ecuación de la recta y utilizarla para aplicarla a los resultados de nuestros estudios sobre suero de ratas problema (**tabla 5**). Una vez establecidas las unidades de absorbancia en base a

concentraciones previamente conocidas la ecuación obtenida es la siguiente:

$$Y = 0,4509 \times X - 0,04041$$

**Tabla 5. Recta patrón de la d-xilosa.** Mediante la gráfica obtenida se extrapoló la cantidad de d-xilosa presente en los sueros mediante la medición de la absorbancia.

Absorbancia	D-Xilosa (mg/mL)
2,301	1
1,8561	0,875
2,0052	0,8
1,7466	0,75
1,5034	0,625
1,3267	0,55



Los resultados obtenidos en cada grupo se compararon entre sí mediante el análisis de la varianza o ANOVA.

### 3.2.5. Determinaciones enzimáticas

Se determinaron los siguientes compuestos y enzimas: creatinina, urea, LDH, creatinquinasa, GOT-AST y GOT-ALT.

#### 3.2.5.1. Obtención del suero

La sangre fue obtenida puncionando la vena cava inferior mediante el empleo de una aguja de calibre 23. De ella, se obtuvieron aproximadamente 4 mL y se depositaron en un tubo sin aditivos. A continuación, los tubos con sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Después, se extrajo el suero sobrenadante con una pipeta y se guardaron en tubos Eppendorf.

#### 3.2.5.2. Conservación del suero

Los tubos Eppendorf se conservaron en un congelador a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación enzimática.

### 3.2.5.3. Analíticas

Las determinaciones enzimáticas se realizaron en las instalaciones de Laboratorios Axpe. Para mantener las muestras en condiciones de refrigeración óptimas durante el transporte, se transportaron las muestras dentro de una caja de polipropileno expandido relleno de hielo seco.

## **3.2.6 Análisis estadístico**

Para hacer una inferencia estadística, se emplearon tres tipos de análisis o test:

### 3.2.6.1. Análisis de la varianza (ANOVA)

Para comparar los grupos entre sí, se empleó un test paramétrico de análisis de la varianza (ANOVA).

### 3.2.6.2. Test de Dunnett

Para comparar el grupo control con los grupos de tratamientos experimentales, se efectuó el test de comparación múltiple de Dunnett.

### 3.2.6.3. Test de Tukey

Para comparar todos los grupos entre sí (los tratamientos frente a los controles y a los no tratados, y los tratados entre sí) se utilizó la prueba de Tukey.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. GRADO DE LESIÓN HISTOLÓGICA

El proceso llevado a cabo para la valoración del daño histológico ya ha sido descrito en el apartado correspondiente de Material y Métodos. A continuación, se detallan los resultados obtenidos en la valoración del daño histológico.

En la **tabla 6** se muestran los resultados de la escala Chiu obtenidos en cada animal. Si bien se aprecia una cierta variabilidad individual en los resultados, resulta evidente la diferencia en orden de magnitud entre los controles sanos y los animales sometidos a isquemia y reperfusión. En las dos columnas de la derecha (correspondientes a los animales tratados) resulta evidente que las cifras son menores que en los animales no tratados.

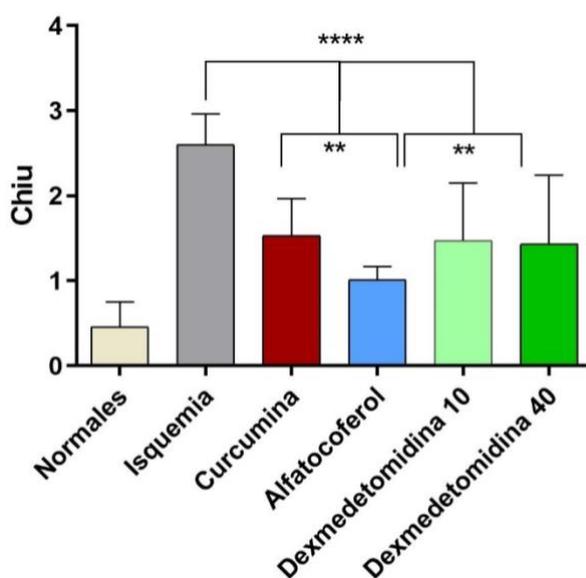
**Tabla 6. Valores obtenidos en cada animal empleando la escala CHIU del 0 al 4.**

Animal	Control	Isq-Rep	Curcumina	$\alpha$ -tocoferol	Dexmed. 10	Dexmed. 40
1	0,125	2,100	1,844	1,000	1,5	2,91
2	0,375	2,219	1,094	0,813	0,94	1
3	0,375	2,690	2,219	0,969	0,44	1,31
4	0,875	2,719	1,406	1,250	1,88	0,94
5	0,750	2,969	0,281	1,031	2,25	1,75
6	0,250	2,906	0,563		1,84	0,69
Media	0,4583	2,601	1,537	1,013	1,475	1,433
D.S.	0,2923	0,3598	0,4288	0,1570	0,6717	0,8099

Lo comentado en el párrafo anterior resulta más evidente si nos fijamos en los estadísticos descriptivos para cada uno de nuestros grupos experimentales. La diferencia en el grado de lesión histológica valorado en los animales sometidos a isquemia y reperfusión es más de seis veces superior al medido en los controles (el daño detectado en estos lógicamente debe de considerarse un “artefacto” debido a la manipulación de las muestras). Esta diferencia alcanza una gran significación estadística ( $p < 0, 0001$ ).

Para comparar los grupos tratados frente al no tratado se realizó una prueba de

ANOVA, seguido de un Test de comparación Múltiple de Dunnett. El resultado del análisis de la varianza resultó altamente significativo ( $p < 0,0001$ ). Al comparar el grupo de Isquemia con el de Isquemia + Curcumina (**figura 12**), se observa que el tratamiento ha provocado una reducción considerable del grado de lesión histológica (diferencia de  $1,064 \pm 0,517$ ). El análisis de Dunnett, muestra que la diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0,01\%$ ).



**Figura 12.** Resultados del daño histológico intestinal mediante el empleo de la escala descrita por Chiu.

El tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol también ha logrado un descenso de la media del grado de lesión histológica con respecto al grupo de Isquemia. Como se aprecia en la figura de arriba, esta diferencia es aún mayor ( $1,588 \pm 0,385$ ). El análisis de DUNNETT, muestra que la diferencia observada entre ambos grupos alcanza un elevadísimo grado de certeza ( $p < 0,00005$ ).

El tratamiento con dexmedetomidina ha demostrado una reducción del daño intestinal con respecto al grupo de Isquemia ( $p < 0,01$ ), sin embargo, su reducción no es tan acusada como en el grupo de  $\alpha$ -tocoferol y es similar a la del grupo de curcumina. No se han hallado diferencias estadísticamente significativas al comparar la reducción del daño intestinal entre el grupo de dosis baja (dexmedetomidina 10) y dosis alta (dexmedetomidina 40).

#### 4.2. PRUEBA DE LA ABSORCIÓN DE LA D-XILOSA

El test de absorción de la D-Xilosa ha demostrado una reducción en la capacidad absorbente de los animales sometidos a isquemia (1,18 vs 2,06;  $p < 0,001$ ).

Como se aprecia en la **figura 13**, los tratamientos ensayados han incrementado la capacidad absorbente de los animales, aunque en grados diferentes. Al hacer la comparación entre los diferentes grupos experimentales mediante el Test de Tukey, observamos varias cosas interesantes. En primer lugar, las cifras de absorción de D-Xilosa de los animales tratados se aproximan mucho a las de los animales sanos, sin que la diferencia que se aprecia en los tratados con curcumina o  $\alpha$ -tocoferol alcancen significación estadística.

En cambio, la mejora observada en los tratamientos frente a los animales con isquemia, pero no tratados sí alcanza significación estadística: curcumina ( $p < 0,005$ ),  $\alpha$ -tocoferol ( $p < 0,04$ ) y dexmedetomidina ( $p < 0,0001$  en ambas dosis). Comparando entre grupos donde se ha administrado un fármaco, se han observado diferencias estadísticamente significativas entre curcumina y dexmedetomidina 10 ( $p < 0,005$ ), curcumina y dexmedetomidina 40 ( $p < 0,001$ ),  $\alpha$ -tocoferol y dexmedetomidina 10 ( $p < 0,001$ ) y  $\alpha$ -tocoferol y dexmedetomidina 40 ( $p < 0,005$ ).

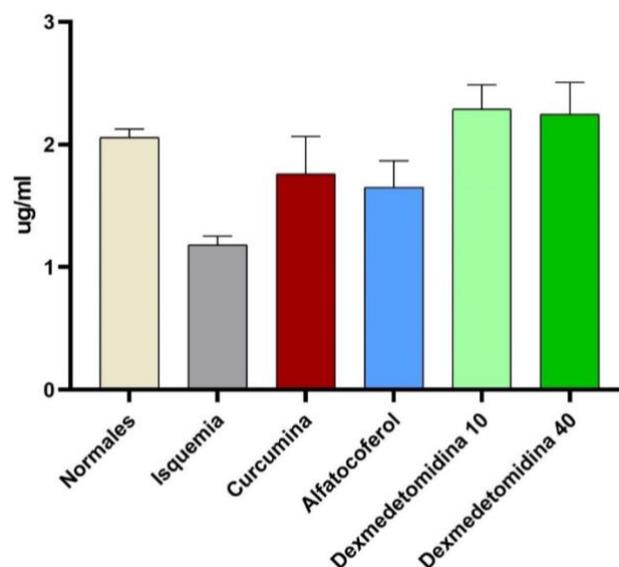


Figura 13. Valores de D-Xilosa alcanzados en suero.

Por el contrario, no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre

diferentes dosis de dexmedetomidina ni entre el grupo Curcumina y  $\alpha$ -tocoferol.

### 4.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

#### 4.3.1. Urea

La interrupción del flujo en la arteria mesentérica superior durante una hora da lugar a un significativo incremento en los niveles sanguíneos de urea, valorados cuatro horas después de restablecer el flujo arterial (26,3 vs 83,6  $p < 0,0001$ ).

En la **figura 14** se observa como las cifras de urea en suero disminuyen con los diferentes tratamientos ensayados. La curcumina induce una reducción ligeramente superior a un 10% (83,6 vs 73,2), aunque esta diferencia no alcanza significación estadística. Lo mismo ocurre con el  $\alpha$ -tocoferol, a pesar de que la reducción es aún mayor (83,6 vs 62,8). En cambio, los dos grupos de animales tratados con dexmedetomidina logran reducir significativamente la elevación de urea producida por la isquemia (83,6 vs 49,2 o 51,7;  $p < 0,01$ ). Aún con todo, estos animales que recibieron dexmedetomidina siguen teniendo unas cifras de urea que duplican los valores normales.

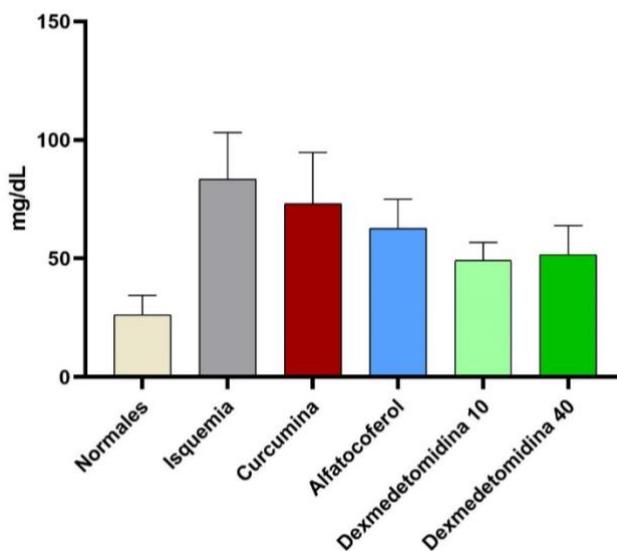


Figura 14. Valores de urea (BUN) obtenidos en mg/dL.

#### 4.3.2. Creatinina

El clampaje de la arteria mesentérica superior durante una hora da lugar a un incremento significativo de los niveles de creatinina en suero cuatro horas después del

episodio. De hecho, estos animales duplican las cifras obtenidas en animales normales (0,5483 vs 0,2571;  $p < 0,001$ ).

La comparación con los animales que recibieron tratamiento, realizada mediante la prueba de ANOVA, detecta diferencias significativas en el conjunto, con  $p < 0,0001$ . Tras realizar un análisis comparativo entre cada uno de los grupos experimental mediante la prueba de comparación Múltiple de Tukey, se constata que algunos de los tratamientos han sido eficaces.

Como puede observarse en la **figura 15**, el tratamiento con curcumina no modificó este comportamiento (0,5483 vs 0,5883). En cambio, el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol y con dexmedetomidina. devolvió los valores a niveles próximos a la normalidad, sin que la diferencia alcance significación estadística.

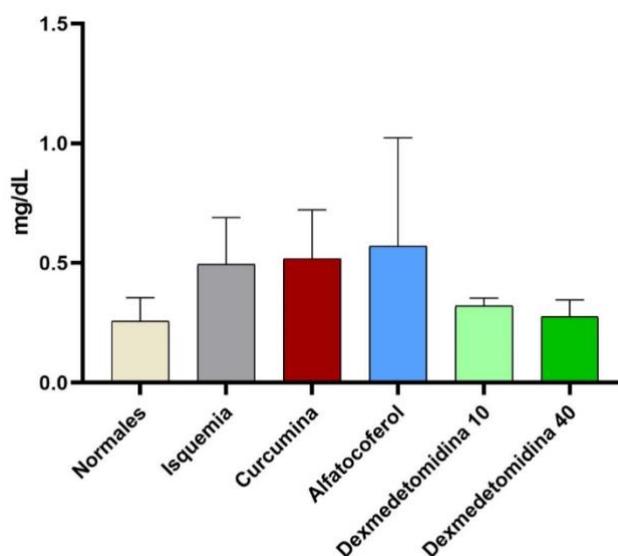


Figura 15. Valores de creatinina obtenidos en mg/dL.

#### 4.3.3. GPT-ALT

El comportamiento de la GPT resulta un poco más errático que el de la GOT. El análisis conjunto del experimento realizado con ANOVA concluye que hay diferencias significativas entre algunos de los grupos experimentales ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, salvo en el grupo de animales tratados con dexmedetomidina a dosis bajas, la variabilidad de los datos dentro de los grupos hace que las diferencias que se observan

(**figura 16**) no alcancen significación estadística (tabla X).

De hecho, no existe diferencia entre los animales sometidos a isquemia y los normales, a pesar de que se duplique la concentración sérica del enzima (tabla Y). Tan solo la elevación de las cifras recogidas en los dos grupos tratados con dexmedetomidina resulta significativa al compararlos con los animales sanos o los isquémicos no tratados.

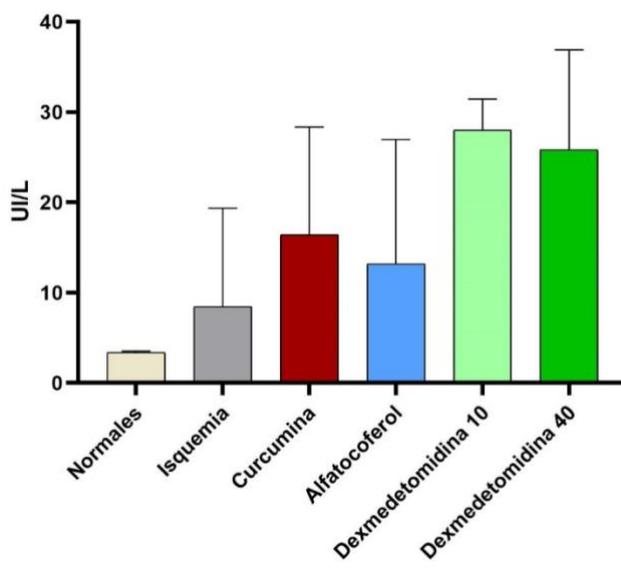


Figura 16. Valores de GPT-ALT obtenidos en UI/L.

#### 4.3.4. GOT-AST

Tras el tiempo establecido de reperusión intestinal, los niveles de GOT/AST se incrementan significativamente en todos los grupos. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas entre los grupos sometidos a isquemia-reperusión.

La isquemia intestinal ha originado una elevación muy importante de la GOT, en valores en torno a 20 veces los de los animales normales (**figura 17**). Esta subida es clínicamente relevante, y con una significación estadística también elevada ( $p < 0,0001$ ).

Ninguno de los tratamientos ensayados ha reducido la elevación de la GOT. La discreta elevación que puede apreciarse en tres de ellos no alcanza significación estadística y tampoco parece que pueda ser muy relevante.

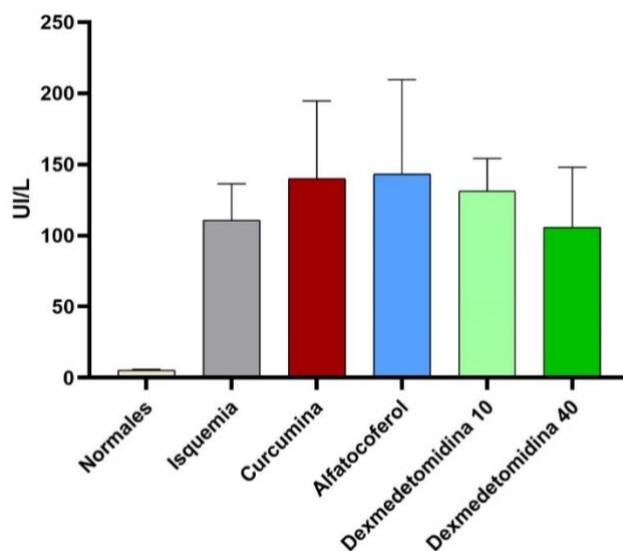


Figura 17. Valores de GOT-AST obtenidos en UI/L.

#### 4.3.5. Creatinquinasa (CK)

Tal y como se puede apreciar en la **figura 18**, todos los grupos experimentales presentaron cifras elevadas de creatín quinasa. El análisis ANOVA informó de la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el conjunto de grupos, con una  $p < 0,005$ .

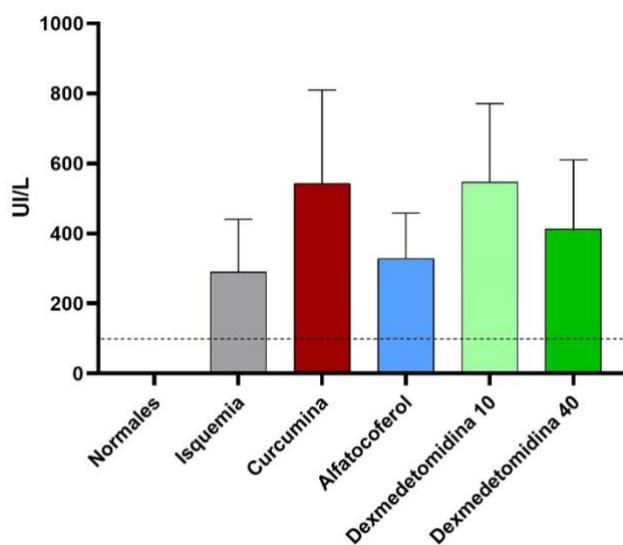


Figura 18. Valores de creatinquinasa obtenidos en UI/L.

Sin embargo, la comparación de los diferentes grupos frente a los animales sanos realizada con el Test de Tukey solo mostró significación estadística para los grupos tratados con curcumina o cualquiera de las dos dosis de dexmedetomidina.

La gran variabilidad registrada en las valoraciones dentro de cada grupo también ha dado lugar a que las diferencias entre los animales no tratados y los tratados no alcancen significación estadística.

#### 4.3.6. Lactato deshidrogenasa (LDH)

Todos los animales sometidos a una hora de isquemia mesentérica han presentado una drástica elevación de los valores de LDH en suero ( $p < 0,001$ ). Desde las 44 UI/L de los animales sanos, la isquemia multiplica la concentración sérica del enzima por más de 10 (44 vs 574). Sin embargo, hay que observar que existe una importante variabilidad intragrupo.

Ninguno de los tratamientos ha logrado reducir este incremento en las cifras de LDH (**figura 19**). De hecho, en el grupo tratado con 10  $\mu$ gr de dexmedetomidina se observa un incremento todavía mayor (tabla XX), aunque la dispersión de valores hace que la diferencia no alcance significación estadística.

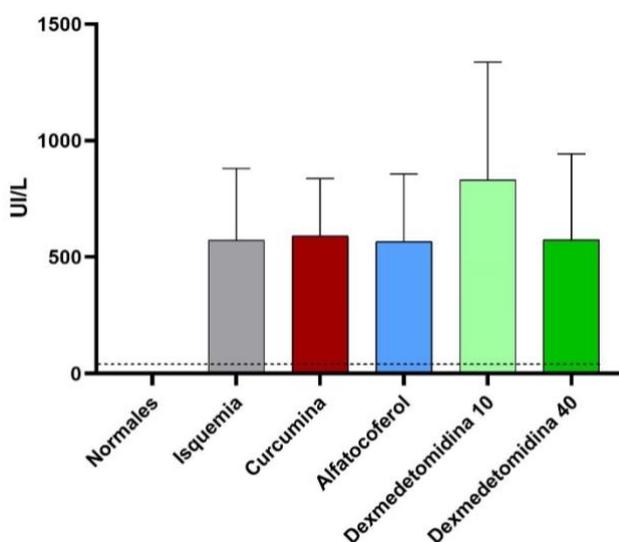


Figura 19. Valores de lactato deshidrogenasa obtenidos en UI/L.

## 5. DISCUSIÓN

La isquemia-reperfusión intestinal, como ente clínico, repercute seriamente en aquel que lo padece y se puede dar en múltiples situaciones clínicas, tales como embolismo arterial (en el contexto de una arritmia cardiaca por fibrilación auricular), disección aortica, trombosis mesentérica, shock hipovolémico e, incluso, en enfermedades reumáticas como la panarteritis nodosa. Hay múltiples factores involucrados en la instauración del daño a nivel local y sistémico, tales como la activación de neutrófilos y macrófagos como consecuencia de la lesión endotelial de los órganos afectados, la liberación de radicales libres de oxígeno al torrente sanguíneo y la liberación de citoquinas que multiplican la respuesta inflamatoria que conducen a la desestructuración de los tejidos afectados por la isquemia y en última instancia a un estado de disfunción multiorgánica.

### 5.1. IDONEIDAD DEL MODELO EXPERIMENTAL

El modelo murino de isquemia-reperfusión ha sido ampliamente utilizado en modelos experimentales debido a la óptima posibilidad de simulación de una oclusión vascular mesentérica aguda (aunque también se han utilizado en modelos de isquemia hepática, cardiaca, renal, retiniana, cerebral e incluso de las extremidades).

De hecho, hay múltiples estudios con múltiples variaciones, tales como el tiempo de isquemia, el tiempo de perfusión, la dosis de fármaco administrada y su posología. Otro tanto cabe decir de los parámetros analizados para valorar el efecto de la perfusión y de los fármacos ensayados. Todo ello hace dificultoso analizar la validez externa y la eficacia de los compuestos farmacológicos empleados.

#### 5.1.1. Tiempo de isquemia y perfusión

Las publicaciones que utilizan la rata como modelo de isquemia-reperfusión intestinal son muy numerosas (por encima de las cuarenta publicaciones/año en los últimos 20 años).

Sin embargo, si nos fijamos en la duración de la isquemia y en el tiempo tras iniciar la perfusión en el que se estudian los efectos, no existe ningún consenso. Revisando los primeros 25 trabajos que ofrece PubMed con los términos “mesenteric ischemia AND rat”, se ve que la variabilidad es enorme (50–63) (**tabla 7**).

**Tabla 7. Diferentes tiempos empleados en modelos de isquemia-reperusión.**

<b>Autor</b>	<b>Duración isquemia (min.)</b>	<b>Tiempo de reperusión (h.)</b>
Ucar BI et al., 2020	30	1
Gendy AM et al., 2021	30	2
İkiz Ö et al., 2021	30	12
Sampaio de Holanda G et al., 2021	35	3/4
Yıldırım E et al., 2021	45	1 y 1/2
Orak C et al., 2021	45	2
Toropova YG et al., 2018	60	1/2
Dere Günal Y et al., 2020	60	1
Olatunji-Akioye et al., 2020	60	1
Almoiliqy M et al., 2020	60	2
Wu MB et al., 2020	60	2
Açıksari K et al., 2019	60	72
Lai HJ et al., 2021	90	Varios tiempos
Dominowski L et al., 2021	120	3

En el caso de nuestro experimento, decidimos utilizar 1 hora de isquemia por considerar que es el tiempo mínimo que puede transcurrir desde que se instaura el cuadro clínico hasta que se recurre a la retirada del embolo. Por un lado, consideramos que un tiempo inferior a una hora de isquemia podría ser insuficiente para que el tejido fuera suficientemente dañado; por otro lado, un tiempo superior a una hora podría condicionar la aparición de lesión mucho más masiva, haciendo por ello más difícil poner de manifiesto los beneficios de los compuestos a estudio. En cuanto al tiempo de reperusión, las 4 horas se establecieron para dar tiempo suficiente a que se instaurasen las lesiones anatomopatológicas derivadas de la activación inmunológica debido a la agresión. Esto concuerda con algunos estudios como el de Guzmán de la Garza et al. (64), donde analizaron el periodo donde se elevaban los marcadores de daño, tanto histológico como bioquímico. En él se observó que el pico máximo de daño intestinal mediante la escala Chiu se obtenía a las 3 horas de la reperusión empleando media hora de isquemia, reforzando nuestro modelo de tiempo empleado. Aun y todo, los modelos murinos, por diversas razones, plantean dificultades para extrapolar sus resultados a la experimentación clínica. La primera es que

habitualmente no se sabe con certeza el momento exacto en el que se instaura la isquemia intestinal (ya que habitualmente es una patología de inicio extrahospitalario), y ese condicionante dificulta determinar el tiempo que lleva el intestino privado de riego sanguíneo. La segunda, se encuentra la idea de que el tratamiento debe ser emergente ya que el cuadro supone un riesgo vital para el paciente, y sería éticamente reprochable esperar a que pasase un tiempo determinado desde que se instaura el cuadro hasta su tratamiento pudiendo hacer esto último con anterioridad.

### **5.1.2. Fármacos empleados**

Desde que se describió el síndrome isquemia-reperusión, se ha recurrido a fármacos de muy diverso tipo para controlar el daño que produce. Los primeros estudios se centraron en el empleo de sustancias antioxidantes (SOD, GSH, ácido fólico, vitamina E...) ya que se conocía su papel en la reducción del daño en situaciones de estrés oxidativo (65). Sin embargo, a lo largo de los años, se ha ido conociendo mejor la fisiopatología de la isquemia reperusión y el papel que en ella juegan la inmunología y la bioquímica molecular. Y este nuevo conocimiento ha ampliado el espectro de sustancias potencialmente útiles en el control del daño por reperusión.

Hoy en día se sabe que el factor clave en el daño causado por la isquemia-reperusión es la activación del sistema inmune innato y la introducción del organismo en un estado proinflamatorio descontrolado. Las moléculas alteradas por los radicales libres de oxígeno son las responsables de esta activación incontrolada, ya que sufren una alteración estructural que el sistema inmune las reconoce como estructuras ajenas al mismo (66).

Nuestro experimento analiza el efecto de un fármaco antioxidante, curcumina, y uno antiinflamatorio, dexmedetomidina, a la vez que incluye el  $\alpha$ -tocoferol como fármaco de eficacia ya probada previamente (28,29).

La curcumina es una sustancia natural, ampliamente utilizada en la cultura indioasiática y que actualmente está emergiendo como molécula con múltiples aplicaciones. Además de ensayarse como antioxidante en estudios de isquemia-reperusión (20,22–24,67), también se describen propiedades antineoplásicas (68,69). Por otra parte, la dexmedetomidina, además de reducir los niveles séricos de mediadores proinflamatorios, tiene un claro efecto analgésico y sedante. Por estas dos últimas

propiedades es actualmente el fármaco de referencia para la sedación en las unidades de cuidados intensivo (70), puesto que reduce las dosis de anestésicos y otros fármacos. En estos entornos los pacientes se suelen encontrar en situaciones de gran estrés oxidativo (estados de shock, estatus epilépticos, ictus, infartos agudos de miocardio...) con lo cual supone un gran interés averiguar si este compuesto farmacológico posee un factor protector frente al estrés oxidativo que provoca la isquemia intestinal.

Al igual que con los tiempos empleados, no hay homogeneidad en cuanto a la posología de los fármacos empleados. Esto hace difícil determinar con claridad si existe un beneficio terapéutico o no a la hora de emplear los fármacos en este cuadro clínico, ya que la ventana terapéutica de cada uno de ellos podría ser distinta. En cuanto a la forma de administración y a los parámetros farmacocinéticos, existen diferencias entre los unos a los otros. Mientras que existen formas de administrar  $\alpha$ -tocoferol y dexmedetomidina por vía parenteral, aun no existen preparados farmacéuticos comercializados de curcumina parenteral, siendo más difícil determinar la biodisponibilidad de este último, así como los tiempos de absorción.

### **5.1.3. Técnica de clampaje empleada**

En este estudio la isquemia se ha inducido con el uso de un clip Yasargil. Es un instrumento ampliamente usado en neurocirugía, y en este caso, idóneo para provocar una isquemia en un vaso, ya que es adecuado en cuanto a tamaño, reversible (ya que es atraumático) y fácil de manipular. Es cierto que también es posible provocar la isquemia mediante ligaduras, pero resulta más traumático y no asegura tanto la adecuada repermeabilización del vaso. Por este motivo, el uso de clips vasculares es la técnica de elección en los modelos experimentales.

### **5.1.4. Valoración del daño histológico**

Desde la publicación de la escala Chiu en 1970 por el autor que lleva su nombre (48), ésta se ha convertido en la herramienta estándar para la valoración histológica del daño intestinal. Esto lo convierte en una técnica útil para comparar los resultados de nuestro estudio con los del resto, ya que la gran mayoría de los estudios emplean la misma escala. Sin embargo, cabe considerar que la valoración es individuo-dependiente, así que podría haber diferencias en cuanto a la interpretación de los grados en cada

muestra. En este estudio hemos buscado disminuir la subjetividad de la valoración mediante dos precauciones: por un lado, realizando la medición a doble ciego, y, por otro lado, encargando una segunda determinación a un especialista en anatomía patológica ajeno a este estudio, para contrastar los resultados.

### **5.1.5 Valoración del funcionalismo intestinal**

La prueba funcional más consolidada para estudiar la capacidad absorptiva del intestino es la prueba de la D-Xilosa. Esta molécula es un monosacárido que es absorbido por el intestino delgado en la porción proximal del intestino delgado y no puede ser metabolizado por el ser humano (71) por lo que su presencia tanto en sangre como en orina depende exclusivamente de la aportación externa. Es una prueba sencilla ya que los reactivos para su utilización son baratos y accesibles, y la técnica no presenta complejidad alguna; únicamente requiere de un espectrofotómetro básico para llevarla a cabo. Esto es lo que nos ha decidido por esta prueba en nuestro experimento.

En general, se considera que la prueba de la D-Xilosa valora la capacidad de absorción del intestino delgado proximal (71), lo que podría indicar que no sería de mucha utilidad en un modelo de isquemia por oclusión de la arteria mesentérica inferior, ya que los principales daños se observan en el íleon terminal. De hecho, Stanley et al. (72) en un modelo de isquemia crónica en perros encontraron que el bloqueo exclusivo de la arteria mesentérica inferior no afectaba los resultados de la prueba de la D-Xilosa, mientras que en los animales en los que también se clampó el tronco celiaco se produjo una significativa reducción de la absorción de D-Xilosa. Sin embargo, Sileri et al. (73), en un modelo de isquemia por oclusión de la arteria mesentérica inferior de tan sólo 45 minutos, pero repetido por tres veces con una semana de decalaje, objetivaron un daño crónico de la mucosa yeyunal que se acompañó de una reducción en la absorción de D-Xilosa. Además, Fujimoto et al. (74), en un modelo de isquemia mesentérica en rata de una hora de duración, comprobó que tras retirar el clamp existía una reducción del 15% en el flujo sanguíneo de la totalidad del intestino delgado (exceptuado el duodeno) que se prolongaba durante 24 horas. Además, hasta completadas las primeras 48 h, la absorción intestinal de lípidos permanecía reducida. Así pues, la elección de la prueba de la D-Xilosa para detectar daño funcional en el intestino sometido a reperusión no carece de fundamento.

Hay otras pruebas de diseño más reciente para valorar la función absorbiva del intestino delgado, entre los que destacan la prueba de trioleína-C<sup>14</sup> para valorar alteraciones en la digestión de los triglicéridos, o la prueba de Schilling, para la vitamina B12. Sin embargo, estas pruebas requieren de equipamiento muy sofisticado y manejo de materiales radiactivos, haciéndolas poco adecuadas al entorno de la experimentación animal.

## **5.2. EFECTOS DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS A NIVEL HISTOLOGICO**

Los tres fármacos han demostrado reducir el daño a nivel histológico, aunque con diferencias entre sí. Por un lado, se ha observado que la vitamina E ha sido el fármaco más potente en cuanto a su capacidad en la disminución del grado de las lesiones. En cambio, la curcumina y la dexmedetomidina (independientemente de la dosis) han demostrado reducir de manera similar el daño histológico, pero en menor grado que con la vitamina E.

### **5.2.1. $\alpha$ -tocoferol**

El tratamiento de nuestros animales con vitamina E ha reducido el daño histológico a menos de un 40% de lo valorado en animales no tratados. En experiencias previas de nuestro grupo, pero utilizando 2 horas de isquemia y 1 h de reperfusión, el  $\alpha$ -tocoferol, a idéntica vía y tiempo de administración, tan solo redujo en un 20% el daño histológico (75). Esto puede deberse a que la mayor agresividad del modelo deja menor margen para el beneficio de los tratamientos. Si fuera así, el tiempo de 1 hora de isquemia probaría ser una elección acertada.

Anteriormente se ha expuesto que la vitamina E ejercía el efecto más potente a nivel antioxidante. Estudios como el de Günel et al., 1998 demuestran que la vitamina E es capaz de reducir el daño histológico tras una hora de isquemia y una hora de reperfusión administrando 10mg/kg de vitamina E 15 minutos antes de la reperfusión (76).

### **5.2.2. Curcumina**

En el caso de la curcumina, hay diversos estudios que demuestran su capacidad protectora frente al daño por isquemia, empleando tiempos y posologías distintas. En

un estudio publicado por Karatepe et al. (67) descubrieron que la administración de 40mg/kg de curcumina oral 15 días antes de la intervención reducía el daño histológico (de 5 a 1,5), medido 24 horas tras la reperfusión. En otro estudio Yucel et al., (22), administraron 100mg/kg de curcumina 3 días antes de la intervención, logrando una reducción del daño en casi un tercio con respecto al grupo sin tratamiento, valorada en un modelo de una hora de isquemia, seguido de una hora de reperfusión. De manera similar, Nurullahoglu et al. (23) y Guzel et al. (77) También disminuyeron el daño intestinal con pautas de administración de curcumina días antes de la isquemia y valorando el efecto tras 2 y 1 hora de reperfusión. Sin embargo, Onder et al. (24), administrando 200mg/kg de curcumina 15 minutos antes de la intervención, cuantificaron el daño tan solo una hora tras la reperfusión y sólo obtuvieron una reducción muy ligera del daño, que no fue estadísticamente significativa. Esto parece indicar que para poder objetivar el beneficio del tratamiento con curcumina es más relevante el tiempo transcurrido desde la administración del fármaco que el tiempo de reperfusión o la dosis de sustancia administrada. De hecho, esto explicaría que nosotros, al administrar la curcumina 24 h antes y hacer el estudio 4 horas tras la reperfusión, hayamos encontrado reducción del daño histológico intestinal con las dosis de curcumina que no resultaron útiles en el estudio de Onder.

Sin embargo, esta interpretación contradice lo publicado por Bo y Feng (78) en un estudio de daño por reperfusión en extremidades inferiores. Administrando la curcumina una vez concluida la isquemia refieren una disminución de los daños producidos por la reperfusión a nivel pulmonar.

### **5.2.3. Dexmedetomidina**

En general puede decirse que los trabajos publicados sobre el uso de dexmedetomidina para reducir el daño por reperfusión coinciden en varios aspectos. El tratamiento administrado una vez iniciada la reperfusión no mejora el daño en la mucosa intestinal. La administración previa al inicio de la isquemia se muestra útil para reducir el daño por reperfusión, y su eficacia es dosis-dependiente. En un estudio realizado por Zhang et al. (37) observaron que la administración de 5 µg/kg de dexmedetomidina intravenosa en perfusión continua, 1 hora antes de la isquemia, redujo significativamente el daño intestinal. Por otra parte, otro investigador, también

llamado Zhang (38), demostró que la administración de 10, 20 o 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de dexmedetomidina 30 minutos antes de la isquemia, reduce el daño histológico respecto al grupo no tratado, en un modelo de una hora de isquemia y dos de reperfusión. Aunque la reducción del índice de Chiu fue progresiva al incrementar la dosis de dexmedetomidina. Sin embargo, no las diferencias entre las diferentes dosis no alcanzaron significación estadística. Estos resultados concuerdan con nuestros hallazgos, tras la administración de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  15 minutos antes de inducir la isquemia, examinando el intestino tras 4 horas de reperfusión. Como dice este autor, el hecho de que el efecto de este fármaco sólo se muestre si se administra antes de producirse la isquemia, reduce su posible aplicabilidad clínica. Sin embargo, los estudios con administración durante o tras la isquemia han examinado el daño en momentos bastante tempranos (2 horas o menos de reperfusión); pudiera ser que si se hicieran estudios más tardíos (6, 12 o 24 h de reperfusión) pudiera objetivarse un efecto terapéutico, tal como se ha visto con otros fármacos en otros modelos experimentales Bo y Feng (78).

### **5.3. REPERCUSIÓN SISTÉMICA DE LA REPERFUSIÓN DEL INTESTINO ISQUÉMICO**

El síndrome de isquemia-reperfusión, además de dañar el tejido que ha experimentado la isquemia, puede afectar a otros órganos distantes. Dado que un componente relevante del daño por reperfusión se deriva del ataque indiscriminado que las células endoteliales experimentan por parte de células inflamatorias, aquellos órganos particularmente ricos en capilares, como el hígado o el riñón, resultan especialmente sensibles a los efectos de la reperfusión.

Un fármaco será más eficaz en el tratamiento del síndrome de reperfusión si, además de reducir el daño local en el tejido isquémico, reduce la afectación sistémica. Por este motivo hemos incluido en nuestro estudio la determinación de parámetros serológicos que permitan valorar la afectación del hígado y del riñón.

Así, los resultados de nuestro estudio muestran una clara afectación hepática manifestada por la elevación de las enzimas hepáticas (GOT-AST, GPT-ALT) y la LDH. Esto concuerda con la relación anatómica estrecha que hay entre el intestino delgado y el hígado, ya que las sustancias presentes en el intestino (bien porque las ha

absorbido o las ha creado *de novo*) son transportadas directamente a los sinusoides hepáticos mediante la vena mesentérica superior, que confluye con la vena mesentérica inferior y la vena esplénica en la vena porta, que se ramifica dando los sinusoides hepáticos. La afectación hepática en los cuadros de reperfusión intestinal está bien documentada en la literatura (34,39,79). Ninguno de los tratamientos que hemos empleado ha logrado reducir la elevación de estas enzimas. Sin embargo, no podemos concluir que los fármacos no sean útiles sobre el daño sistémico, ya que el estudio se ha reducido a una ventana temporal muy estrecha. Sería necesario hacer experiencias en las que evaluar los movimientos enzimáticos en plazos más largos. De hecho, en un estudio publicado por Guzmán-de la Garza et al. (64), se observó que el nivel máximo de daño histológico mediante la escala Chiu se obtenía a las 3 horas desde la reperfusión, mientras que el pico de LDH se conseguía al de una hora y después descendía rápidamente, mientras que los valores de ALT y AST lograban sus concentraciones máximas al de 3 horas, pero se mantenían elevadas más tiempo.

Por otro lado, la elevación de los niveles séricos de creatinina urea demuestran que el riñón también ha resultado dañado tras la isquemia. Una elevación anormal de los niveles de creatinina respecto a su valor basal indica que la función glomerular está siendo comprometida por algún tipo de agresión. Hay estudios como el de Lai et al. (61), 2021, que demuestran que las lesiones por isquemia intestinal afectan a órganos distantes, como el riñón, ya que, tras 90 minutos de isquemia y seis horas de reperfusión intestinal, encontraron elevación de marcadores de daño renal, tales como la BUN o la creatinina, y lesiones estructurales microscópicas renales. Es interesante resaltar que, en nuestra experiencia, los grupos que recibieron dexmedetomidina presentaron una elevación más discreta de la creatinina. Este efecto no resultó dosis dependiente. Sin embargo, no puede concluirse que esto se deba al efecto protector frente a la isquemia, ya que la dexmedetomidina tiene un claro efecto hipotensor (80) que bien pudiera contribuir a reducir el daño renal durante la reperfusión.

Por último, la elevación de las cifras de creatinquinasa pueden sugerir que el cuadro de isquemia-reperfusión también puede afectar a la musculatura estriada. Sin embargo, no hemos encontrado datos en la literatura que refrenden nuestro hallazgo ni que

puedan sugerir el mecanismo lesional. Además, al igual que ha ocurrido con el daño hepático, ninguno de los fármacos utilizados ha reducido esta elevación enzimática. De nuevo hay que considerar la posibilidad de que un estudio a plazos más largos mostrara algún efecto a este nivel.

Aun y todo el estudio enzimático tiene limitaciones que son necesarias remarcar. Por un lado, los buenos resultados a nivel histológico no se correlacionan con los niveles plasmáticos de las sustancias. Esto puede deberse, bien a una técnica defectuosa durante la toma o el procesamiento de las muestras, o bien a que la sustancia analizada no se encuentre en la ventana temporal adecuada al momento de la medición. En un estudio publicado por Guzmán-de la Garza et al., 2013 se observó que el nivel máximo de daño histológico mediante la escala Chiu se obtenía a las 3 horas desde la reperusión, mientras que el pico de LDH se conseguía al de una hora y después descendía rápidamente, mientras que los valores de ALT y AST lograban sus concentraciones máximas al de 3 horas, pero se mantenían elevadas más tiempo (64).

#### **5.4. EFECTO SOBRE LA CAPACIDAD ABSORTIVA DEL INTESTINO**

En nuestros resultados se puede observar que la isquemia reduce la capacidad de absorción de D-Xilosa por parte del intestino, ya que sus niveles séricos son notablemente inferiores a los niveles de D-xilosa en sangre de animales que no han sido sometidos a isquemia. Que la isquemia mesentérica haya reducido la absorción de D-Xilosa coincide con lo referido por Sileri et al. (73) y Morini et al. (81), si bien ambos estudios se refieren a un modelo de isquemia crónica. No hemos encontrado en la bibliografía consultada experimentos con modelos de isquemia intestinal aguda que hayan valorado absorción de D-Xilosa. Lo más próximo es un estudio sobre íleon “in vitro” en el que tras una isquemia de una hora se constata que la absorción de glucosa cae a un 11% y la de glutamina a un 44%, mientras se preserva la función de barrera para moléculas grandes (entre 376 D y 40 kD) (82).

En cambio, los tres fármacos empleados en nuestro estudio han logrado aumentar las concentraciones de D-xilosa en sangre. De entre los tres, la dexmedetomidina ha sido el compuesto que más ha logrado aumentar las concentraciones de la D-xilosa, llegando a alcanzar concentraciones similares a los del grupo sin isquemia. Sin embargo, no se han observado diferencias al emplear concentraciones bajas o altas del

mismo fármaco. El  $\alpha$ -tocoferol ha tenido resultados más modestos que la dexmedetomidina, y la curcumina ha sido el compuesto que menos impacto ha tenido sobre la elevación de sus valores en sangre.

Estos resultados pueden ser debidos a los cambios lesivos en el epitelio intestinal derivados de la isquemia-reperfusión. La destrucción de las vellosidades conlleva una disminución de la capacidad absorptiva del intestino delgado (83) que puede justificar dicha reducción en los niveles de D-xilosa en sangre. Aun y todo, cabe destacar que no queda del todo claro cuál es el motivo concreto de dicha reducción. Hay que considerar que el  $\alpha$ -tocoferol es el compuesto que más ha reducido el daño a nivel histológico, pero no el que más ha elevado las concentraciones de d-xilosa en sangre, ya que esto corresponde a la dexmedetomidina. Cabe pensar que ya que la dexmedetomidina, al ser un  $\alpha$ -2 adrenérgico, mejora la motilidad intestinal, este efecto redunde a su vez en una mejoría en la capacidad absorptiva (84,85).

## 6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La oclusión vascular mediante el clip Yasargil constituye una técnica fiable para estudiar la reperfusión tras isquemia mesentérica aguda completa.
- El daño producido por la isquemia-reperfusión intestinal puede ser bien definido mediante el análisis histopatológico de la mucosa. Este parámetro es útil para valorar la eficacia de los tratamientos.
- La reperfusión del intestino reduce su capacidad de absorción de D-Xilosa, por lo que esta prueba resulta de utilidad en ensayos terapéuticos.
- El daño sistémico inducido por la reperfusión del intestino se traduce en alteraciones de la bioquímica sanguínea.
- La administración de curcumina,  $\alpha$ -tocoferol y dexmedetomidina ha logrado una reducción del grado de daño histopatológico, sin que dicha reducción se haya correlacionado con mejoría de los parámetros bioquímicos analizados.
- Estos tres fármacos han mejorado la absorción intestinal de D-Xilosa, reducida por la isquemia.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Stone JR, Wilkins LR. Acute mesenteric ischemia. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology* [Internet]. 2015;18(1):24–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.tvir.2014.12.004>
2. Bala M, Kashuk J, Moore EE, Kluger Y, Biffl W, Gomes CA, et al. Acute mesenteric ischemia: Guidelines of the World Society of Emergency Surgery. *World Journal of Emergency Surgery*. 2017;12(1):1–11.
3. Chi A, Stone JR. Mesenteric ischemia. *IR Playbook: A Comprehensive Introduction to Interventional Radiology*. 2018;271–84.
4. Aziz AA, Christmas D. Acute Mesenteric Ischemia in a Chronically Anticoagulated Patient with Atrial Fibrillation: Anticoagulation Reversal, Management and Preventing Recurrence. *Cureus*. 2022;14(1):3–6.
5. Kühn F, Schiergens TS, Klar E. Acute Mesenteric Ischemia. *Visceral Medicine*. 2020;36(4):256–63.
6. Cudnik MT, Darbha S, Jones J, Macedo J, Stockton SW, Hiestand BC. The Diagnosis of Acute Mesenteric Ischemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Academic Emergency Medicine*. 2013 Nov 1;20(11):1087–100.
7. Park WM, Gloviczki P, Cherry KJ, Hallett JW, Bower TC, Panneton JM, et al. Contemporary management of acute mesenteric ischemia: Factors associated with survival. *Journal of Vascular Surgery*. 2002;35(3):445–52.
8. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: Microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2011;396(1):13–29.
9. Pérez JL. Sisinio de Castro. *Manual de Patología General*. 7º. Pérez JL, editor. Barcelona: Elsevier MASSON; 2013. 304 p.
10. Li J, Cao F, Yin H liang, Huang Z jian, Lin Z tao, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death and Disease*. 2020;11(2).

11. Grootjans J, Lenaerts K, Buurman WA, Dejong CHC, Derikx JPM. Life and death at the mucosal-luminal interface: new perspectives on human intestinal ischemia-reperfusion. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(9):2760–70.
12. Kandemir M, Yaşar NF, Özkurt M, Özyurt R, Bektur Aykanat NE, Erkasap N. The role of anakinra in the modulation of intestinal cell apoptosis and inflammatory response during ischemia/reperfusion. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2021;51(4):2177–84.
13. Savlania A, Tripathi RK. Acute mesenteric ischemia: Current multidisciplinary approach. *Journal of Cardiovascular Surgery*. 2017;58(2):339–50.
14. Olson KA, Teixeira PG. Mesenteric Ischemia: When and How to Revascularize. *Advances in Surgery*. 2021;55:75–87.
15. Miguelena JM. Cirugía para el grado de Medicina. In *Editorial Médica Panamericana*; 2019. p. 418.
16. Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramírez-Tortosa C, Ramírez-Tortosa MC. Curcumin and health. *Molecules*. 2016;21(3):1–22.
17. Lestari MLAD, Indrayanto G. Curcumin. Vol. 39, *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. 2014. 113–204 p.
18. Kharat M, Du Z, Zhang G, McClements DJ. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017;65(8):1525–32.
19. Bharat B A, Chitra Sundaram, Nikita Malani, Haruyo I. Curcumin: The Indian solid gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2007;595:1–75. Available from: [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L354122020%0Ahttp://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5\\_1](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L354122020%0Ahttp://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_1)
20. Tian S, Guo R, Wei S, Kong Y, Wei X, Wang W, et al. Curcumin protects against the intestinal ischemia-reperfusion injury: involvement of the tight junction protein ZO-1 and TNF- $\alpha$  related mechanism. *Korean J Physiol*

- Pharmacol. 2016/02/23. 2016 Mar;20(2):147–52.
21. Nelson KM, Dahlin JL, Bisson J, Graham J, Pauli GF, Walters MA. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;60(5):1620–37.
  22. Yucel AF, Kanter M, Pergel A, Erboga M, Guzel A. The role of curcumin on intestinal oxidative stress, cell proliferation and apoptosis after ischemia/reperfusion injury in rats. *J Mol Histol*. 2011 Dec;42(6):579–87.
  23. Nurullahoglu-Atalik KE, Okudan N, Belviranli M, Gokbel H, Oz M, Esen H. Role of curcumin in mesenteric ischemia - reperfusion injury in rats. *Bratislavske lekarske listy*. 2012;113(8):465–70.
  24. Onder A, Kapan M, Gumus M, Yuksel H, Boyuk A, Alp H, et al. The protective effects of curcumin on intestine and remote organs against mesenteric ischemia/reperfusion injury. *Turk J Gastroenterol*. 2012 Apr;23(2):141–7.
  25. Medina J, Gupta V. Vitamin E. In *Treasure Island (FL)*; 2020.
  26. Borel P, Preveraud D, Desmarchelier C. Bioavailability of vitamin E in humans: an update. *Nutr Rev*. 2013 Jun;71(6):319–31.
  27. Kemnic TR, Coleman M. Vitamin E Deficiency. In *Treasure Island (FL)*; 2020.
  28. Yağmurdur MC, Ozdemir A, Topaloğlu S, Kiliç K, Ozenç A. Effects of alpha tocopherol and verapamil on liver and small bowel following mesenteric ischemia-reperfusion. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 2002 Mar;13(1):40–6.
  29. Yağmurdur MC, Ozdemir A, Ozenç A, Kiliç K. The effects of alpha - tocopherol and verapamil on mucosal functions after gut ischemia / reperfusion. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*. 2003 Mar;14(1):26–32.
  30. Yoshida WB, Alasio T, Mazziotta R, Qin F, Kashani M, Lee S, et al. Effect of alpha-tocopherol, taurine and selenium on the attenuation of ischemia/reperfusion injury of splanchnic organs. *Cardiovasc Surg*. 1998 Apr;6(2):178–87.

31. Burnett JR, Hooper AJ. Vitamin E and oxidative stress in abetalipoproteinemia and familial hypobetalipoproteinemia. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;88:59–62.
32. Bao N, Tang B. Organ-Protective Effects and the Underlying Mechanism of Dexmedetomidine. *Mediators of Inflammation*. 2020;2020.
33. Yin W, Wang C, Peng Y, Yuan W, Zhang Z, Liu H, et al. Dexmedetomidine alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and cell necroptosis through activating of  $\alpha$ 2-adrenoceptor in H9C2 cells. *Mol Biol Rep*. 2020 May 1;47(5):3629–39.
34. Zhao Y, Kong GY, Pei WM, Zhou B, Zhang QQ, Pan BB. Dexmedetomidine alleviates hepatic injury via the inhibition of oxidative stress and activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Eur Cytokine Netw [Internet]*. 2019 Sep 1 [cited 2022 Jan 16];30(3):88–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31957703/>
35. Uusalo P, Al-Ramahi D, Tilli I, Aantaa RA, Scheinin M, Saari TI. Subcutaneously administered dexmedetomidine is efficiently absorbed and is associated with attenuated cardiovascular effects in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2018;74(8):1047–54.
36. Liu XM, Chen QH, Hu Q, Liu Z, Wu Q, Liang SS, et al. Dexmedetomidine protects intestinal ischemia-reperfusion injury via inhibiting p38 MAPK cascades. *Exp Mol Pathol*. 2020 Aug;115:104444.
37. Zhang XY, Liu ZM, Wen SH, Li YS, Li Y, Yao X, et al. Dexmedetomidine administration before, but not after, ischemia attenuates intestinal injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Anesthesiology*. 2012 May;116(5):1035–46.
38. Zhang X, Zhou J, Hu Q, Liu Z, Chen Q, Wang W, et al. The Role of Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signalling on Preventing Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury with Dexmedetomidine. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020 May;20(5):3295–302.
39. Fan X, Du J, Wang MH, Li JM, Yang B, Chen Y, et al. Irisin Contributes to the

- Hepatoprotection of Dexmedetomidine during Intestinal Ischemia/Reperfusion. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:7857082.
40. Chen Y, Bian W, Xu B. Pretreatment with dexmedetomidine alleviates lung injury in a rat model of intestinal ischemia reperfusion. *Mol Med Rep*. 2020 Mar;21(3):1233–41.
  41. Chen M, Yan XT, Ye L, Tang JJ, Zhang ZZ, He XH. Dexmedetomidine Ameliorates Lung Injury Induced by Intestinal Ischemia/Reperfusion by Upregulating Cannabinoid Receptor 2, Followed by the Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:6120194.
  42. Hawkley TF, Maani C V. Isoflurane. In: StatPearls Publishing. Treasure Island (FL); 2020.
  43. Jiang M, Sun L, Feng DX, Yu ZQ, Gao R, Sun YZ, et al. Neuroprotection provided by isoflurane pre-conditioning and post-conditioning. *Med Gas Res*. 2017;7(1):48–55.
  44. Burchell SR, Dixon BJ, Tang J, Zhang JH. Isoflurane provides neuroprotection in neonatal hypoxic ischemic brain injury. *J Investig Med*. 2013 Oct;61(7):1078–83.
  45. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Isoflurane [Internet]. CID=3763. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoflurane>
  46. Knuf K, Maani C V. Nitrous Oxide. In Treasure Island (FL); 2020.
  47. Bilbao Axpe J. Valoración de la reperfusión intestinal en ratas sometidas a tratamientos con antioxidantes. UPV/EHU; 1990.
  48. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*. 1970 Oct;101(4):478–83.
  49. Houtmeyers A, Duchateau L, Grünewald B, Hermans K. Reference intervals for biochemical blood variables, packed cell volume, and body temperature in

- pet rats (*Rattus norvegicus*) using point-of-care testing. *Veterinary Clinical Pathology*. 2016;45(4):669–79.
50. Açiksari K, Eğin S, Hepgül G, Mirasoğlu B, Tanriverdi G, Kanber DS, et al. Protective effect of hyperbaric oxygen treatment on rat intestinal mucosa after mesenteric ischaemia and reperfusion. *Diving Hyperb Med*. 2019 Dec;49(4):253–8.
  51. Dominowski L, Kirsch M. Synergistic Effect of  $\beta$ -alanine and Aprotinin on Mesenteric Ischemia. *J Surg Res*. 2021 Jul;263:78–88.
  52. Olatunji-Akioye A. Histomorphometry of Rat Testes Following Intestinal Ischaemia-Reperfusion Injury and Splenectomy. *Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria*. 2020 Dec;35(2):209–12.
  53. Almoiliqy M, Wen J, Xu B, Sun YC, Lian MQ, Li YL, et al. Cinnamaldehyde protects against rat intestinal ischemia/reperfusion injuries by synergistic inhibition of NF- $\kappa$ B and p53. *Acta Pharmacol Sin*. 2020 Sep;41(9):1208–22.
  54. Toropova YG, Pechnikova NA, Zelinskaya IA, Zhuravsky SG, Korniyushin O V, Gonchar AI, et al. Nicotinamide riboside has protective effects in a rat model of mesenteric ischaemia-reperfusion. *Int J Exp Pathol*. 2018 Dec;99(6):304–11.
  55. Orak C, Şirinyıldız F, Gökmen Yılmaz E, Cesur G, Ek RO. Protective effects of *Ficus carica* seed oil on ischemia and reperfusion injury in a rat model of acute mesenteric ischemia. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery : TJTES*. 2021 Jul;27(4):402–9.
  56. Yıldırım E, Özer H, Özer İ, Koyuncu A, Yıldırım T. The effects on bacterial translocation and tissue damage of selenium treatment in an experimental intestinal ischaemia-reperfusion model. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery : TJTES*. 2021 Jul;27(4):389–94.
  57. Gendy AM, Amin MM, Al-Mokaddem AK, Abd Ellah MF. Cilostazol mitigates mesenteric ischemia/reperfusion-induced lung lesion: Contribution of PPAR-

- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B, and STAT3 crosstalk. *Life Sci.* 2021 Feb;266:118882.
58. Ucar BI, Erikci A, Kosemehmetoglu K, Ozkul C, Iskit AB, Ucar G, et al. Effects of endothelin receptor blockade and COX inhibition on intestinal I/R injury in a rat model: Experimental research. *Int J Surg.* 2020 nov;83:89–97.
  59. Sampaio de Holanda G, Dos Santos Valença S, Maran Carra A, Lopes Lichtenberger RC, Franco OB, Ribeiro BE, et al. Sulforaphane and Albumin Attenuate Experimental Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Surg Res.* 2021 Jun;262:212–23.
  60. İkiz Ö, Kahramansoy N, Erkol H, Koçoğlu E, Fırat T. Effects of Lycopene in Intestinal Ischemia Reperfusion Injury via Intestinal Immunoglobulin A. *J Surg Res.* 2021 Nov;267:63–70.
  61. Lai HJ, Zhan YQ, Qiu YX, Ling YH, Zhang XY, Chang ZN, et al. HMGB1 signaling-regulated endoplasmic reticulum stress mediates intestinal ischemia/reperfusion-induced acute renal damage. *Surgery.* 2021 Jul;170(1):239–48.
  62. Wu MB, Ma B, Zhang TX, Zhao K, Cui SM, He SC. Propofol improves intestinal ischemia-reperfusion injury in rats through NF- $\kappa$ B pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020 Jun;24(11):6463–9.
  63. Dere Günal Y, Boybeyi Türer Ö, Atasoy P, Kısa Ü, Aslan MK. The effects of ozone on the acute phase of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery : TJTES.* 2020 Sep;26(5):651–6.
  64. Guzmán-de la Garza FJ, Ibarra-Hernández JM, Cordero-Pérez P, Villegas-Quintero P, Villarreal-Ovalle CI, Torres-González L, et al. Temporal relationship of serum markers and tissue damage during acute intestinal ischemia/reperfusion. *Clinics (Sao Paulo, Brazil).* 2013 Jul;68(7):1034–8.
  65. Vajdovich P. Free Radicals and Antioxidants in Inflammatory Processes and Ischemia-Reperfusion Injury. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice.* 2008;38(1):31–123.
  66. Lee SM, Hutchinson M, Saint DA. The role of Toll-like receptor 4 (TLR4) in

- cardiac ischaemic-reperfusion injury, cardioprotection and preconditioning. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016 Sep;43(9):864–71.
67. Karatepe O, Gulcicek OB, Ugurlucan M, Adas G, Battal M, Kemik A, et al. Curcumin Nutrition for the Prevention of Mesenteric Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Rodent Model. *Transplantation Proceedings*. 2009;41(9):3611–6.
  68. Kuttan R, Bhanumathy P, Nirmala K, George MC. Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Letters*. 1985;29(2):197–202.
  69. Wang Y, Lu J, Jiang B, Guo J. The roles of curcumin in regulating the tumor immunosuppressive microenvironment. *Oncol Lett*. 2020 Apr;19(4):3059–70.
  70. Barends CRM, Absalom A, Van Minnen B, Vissink A, Visser A. Dexmedetomidine versus midazolam in procedural sedation. A systematic review of efficacy and safety. *PLoS ONE*. 2017;12(1):1–12.
  71. Craig RM, Atkinson AJ. D-xylose testing: a review. *Gastroenterology* [Internet]. 1988 [cited 2022 Apr 20];95(1):223–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3286361/>
  72. Stanley JC, Brink BE, Fry WJ. Experimental intestinal ischemia: provocative absorption studies following gradual celiac and superior mesenteric artery occlusion. *J Surg Res* [Internet]. 1973 [cited 2022 Apr 20];14(2):133–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4693917/>
  73. Sileri P, Morini S, Schena S, Rastellini C, Abcarian H, Benedetti E, et al. Intestinal ischemia/reperfusion injury produces chronic abnormalities of absorptive function. *Transplant Proc* [Internet]. 2002 [cited 2022 Apr 20];34(3):984. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12034271/>
  74. Fujimoto K, Price VH, Granger DN, Specian R, Bergstedt S, Tso P. Effect of ischemia-reperfusion on lipid digestion and absorption in rat intestine. *Am J Physiol* [Internet]. 1991 [cited 2022 Apr 20];260(4 Pt 1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2018134/>
  75. J. Bilbao, I. García-Alonso, V. Portugal, P. Barceló, A. Apecechea JM. Eficacia de tratamientos antioxidantes (ácido fólico y  $\alpha$ -tocoferol) en las lesiones

- intestinales inducidas por reperfusión. *Cirugía Española*. 1992;51(4):262–5.
76. Günel E, Cağlayan F, Cağlayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg*. 1998 Oct;33(10):1536–9.
  77. Guzel A, Kanter M, Guzel A, Yucel AF, Erboga M. Protective effect of curcumin on acute lung injury induced by intestinal ischaemia/reperfusion. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2013 [cited 2022 Apr 19];29(7):633–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22252860/>
  78. bo HZ, feng XS. Post-treatment curcumin reduced ischemia-reperfusion-induced pulmonary injury via the Notch2/Hes-1 pathway. *J Int Med Res* [Internet]. 2020 [cited 2022 Apr 19];48(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31891282/>
  79. Mennillo E, Krøkje Å, Pretti C, Meucci V, Arukwe A. Biotransformation and oxidative stress responses in rat hepatic cell-line (H4IIE) exposed to racemic ketoprofen (RS-KP) and its enantiomer, dexketoprofen (S(+)-KP). *Environmental Toxicology and Pharmacology* [Internet]. 2018;59(November 2017):199–207. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.018>
  80. Bao N, Tang B. Organ-Protective Effects and the Underlying Mechanism of Dexmedetomidine. *Mediators of Inflammation*. 2020;2020.
  81. Morini S, Elias G, Brown M, Subbotin V, Rastellini C, Cicalese L. Chronic morpho-functional damage as a consequence of transient ischemia/reperfusion injury of the small bowel. *Histol Histopathol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2022 Apr 20];25(3):277–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20054799/>
  82. Schoots IG, Bijlsma PB, Koffeman GI, van Gulik TM. Hypoxia/reoxygenation impairs glucose absorption and cAMP-mediated secretion more profoundly than glutamine absorption and Ca<sup>2+</sup>/PKC-mediated secretion in rat ileum in vitro. *Surgery* [Internet]. 2006 Feb [cited 2022 Apr 20];139(2):244–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16455334/>
  83. Udassin R, Haskel Y, Samuni A. Nitroxide radical attenuates

- ischaemia/reperfusion injury to the rat small intestine. *Gut* [Internet]. 1998 [cited 2022 Apr 20];42(5):623–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9659154/>
84. Chen C, Huang P, Lai L, Luo C, Ge M, Hei Z, et al. Dexmedetomidine improves gastrointestinal motility after laparoscopic resection of colorectal cancer: A randomized clinical trial. *Medicine* [Internet]. 2016 Jul 26 [cited 2022 Apr 20];95(29). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27442674/>
85. Tufanogullari B, White PF, Peixoto MP, Kianpour D, Lacour T, Griffin J, et al. Dexmedetomidine infusion during laparoscopic bariatric surgery: the effect on recovery outcome variables. *Anesth Analg* [Internet]. 2008 [cited 2022 Apr 20];106(6):1741–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18499604/>

## ANEXO I – TABLAS ADICIONALES

**Tabla A.1. Test de D-Xilosa.** Resultados del análisis comparativo entre los diferentes grupos experimentales.

Diferencia de niveles	Dif. de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor p ajustado
Isquemia - Normal	-1,162	0,185	(-1,728; -0,597)	0,000
IR + C - Normal	-0,295	0,185	(-0,860; 0,270)	0,606
IR + ATF - Normal	-0,404	0,192	(-0,992; 0,183)	0,314
IR + DXM 10 - Normal	0,230	0,185	(-0,335; 0,795)	0,810
IR + DXM 40 - Normal	0,189	0,185	(-0,376; 0,754)	0,906
IR + C - Isquemia	0,867	0,165	(0,362; 1,373)	0,000
IR + ATF - Isquemia	0,758	0,173	(0,228; 1,288)	0,002
IR + DXM 10 - Isquemia	1,392	0,165	(0,887; 1,898)	0,000
IR + DXM 40 - Isquemia	1,351	0,165	(0,845; 1,857)	0,000
IR + ATF - IR + C	-0,109	0,173	(-0,639; 0,421)	0,988
IR + DXM 10 - IR + C	0,525	0,165	(0,020; 1,031)	0,038
IR + DXM 40 - IR + C	0,484	0,165	(-0,022; 0,989)	0,067
IR + DXM 10 - IR + ATF	0,634	0,173	(0,104; 1,165)	0,012
IR + DXM 40 - IR + ATF	0,593	0,173	(0,063; 1,123)	0,022
IR + DXM 40 - IR + DXM 10	-0,041	0,165	(-0,547; 0,464)	1,000

*Nivel de confianza individual = 99,51%*

**Tabla A.2. Niveles séricos de urea (mg/mL).** Resultados del análisis comparativo entre los diferentes grupos experimentales.

Diferencia de niveles	Dif. de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor p ajustado
IR + C - IR	-5,6	10,5	(-36,2; 25,0)	0,983
IR + ATF - IR	-11,7	10,9	(-43,6; 20,1)	0,817
IR + DXM 10 - IR	-29,4	10,9	(-61,3; 2,5)	0,081
IR + DXM 40 - IR	-31,9	10,9	(-63,8; -0,0)	0,050
IR + ATF - IR + C	-6,2	10,9	(-38,0; 25,7)	0,979
IR + DXM 10 - IR + C	-23,8	10,9	(-55,7; 8,0)	0,216
IR + DXM 40 - IR + C	-26,3	10,9	(-58,2; 5,5)	0,142
IR + DXM 10 - IR + ATF	-17,7	11,3	(-50,7; 15,4)	0,534
IR + DXM 40 - IR + ATF	-20,2	11,3	(-53,2; 12,9)	0,405
IR + DXM 40 - IR + DXM 10	-2,5	11,3	(-35,6; 30,6)	0,999

*Nivel de confianza individual = 99,30%*

**Tabla A.3. Niveles séricos de creatinina (mg/mL).** Resultados del análisis comparativo entre los diferentes

grupos experimentales.

Diferencia de niveles	Dif. de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor p ajustado
IR + C - IR	0,024	0,127	(-0,348; 0,396)	1,000
IR + ATF - IR	0,076	0,133	(-0,312; 0,463)	0,978
IR + DXM 10 - IR	-0,174	0,133	(-0,562; 0,213)	0,685
IR + DXM 40 - IR	-0,219	0,133	(-0,607; 0,168)	0,478
IR + ATF - IR + C	0,051	0,133	(-0,336; 0,439)	0,995
IR + DXM 10 - IR + C	-0,199	0,133	(-0,586; 0,189)	0,573
IR + DXM 40 - IR + C	-0,244	0,133	(-0,631; 0,144)	0,374
IR + DXM 10 - IR + ATF	-0,250	0,138	(-0,652; 0,152)	0,385
IR + DXM 40 - IR + ATF	-0,295	0,138	(-0,697; 0,107)	0,232
IR + DXM 40 - IR + DXM 10	-0,045	0,138	(-0,447; 0,357)	0,997

Nivel de confianza individual = 99,30%

**Tabla A.4. Niveles séricos de GPT-ALT (UI/L).** Resultados del análisis comparativo entre los diferentes grupos experimentales.

Diferencia de niveles	Dif. de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor p ajustado
IR + C - IR	3,08	4,03	(-8,20; 14,36)	0,940
IR + ATF - IR	1,19	4,09	(-10,27; 12,66)	0,998
IR + DXM 10 - IR	6,81	4,09	(-4,66; 18,27)	0,464
IR + DXM 40 - IR	6,39	4,09	(-5,07; 17,86)	0,527
IR + ATF - IR + C	-1,89	4,09	(-13,35; 9,58)	0,991
IR + DXM 10 - IR + C	3,73	4,09	(-7,74; 15,19)	0,892
IR + DXM 40 - IR + C	3,31	4,09	(-8,15; 14,78)	0,927
IR + DXM 10 - IR + ATF	5,61	4,16	(-6,04; 17,26)	0,662
IR + DXM 40 - IR + ATF	5,20	4,16	(-6,45; 16,85)	0,723
IR + DXM 40 - IR + DXM 10	-0,41	4,16	(-12,06; 11,23)	1,000

Nivel de confianza individual = 99,34%

Tabla A.5. **Niveles séricos de GOT-AST (U/L)**. Resultados del análisis comparativo entre los diferentes grupos experimentales.

Diferencia de niveles	Dif. de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor p ajustado
IR + C - IR	29,3	24,3	(-41,6; 100,1)	0,747
IR + ATF - IR	32,5	25,2	(-41,3; 106,2)	0,702
IR + DXM 10 - IR	20,5	25,2	(-53,3; 94,2)	0,925
IR + DXM 40 - IR	-5,0	25,2	(-78,8; 68,7)	1,000
IR + ATF - IR + C	3,2	25,2	(-70,6; 76,9)	1,000
IR + DXM 10 - IR + C	-8,8	25,2	(-82,6; 64,9)	0,997
IR + DXM 40 - IR + C	-34,3	25,2	(-108,1; 39,4)	0,657
IR + DXM 10 - IR + ATF	-12,0	26,2	(-88,5; 64,5)	0,990
IR + DXM 40 - IR + ATF	-37,5	26,2	(-114,0; 39,0)	0,614
IR + DXM 40 - IR + DXM 10	-25,5	26,2	(-102,0; 51,0)	0,865

Nivel de confianza individual = 99,30%

Tabla A.6. **Niveles séricos de CK (U/L)**. Resultados del análisis comparativo entre los diferentes grupos experimentales.

Diferencia de niveles	Dif. de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor p ajustado
IR + C - IR	253	108	(-62; 568)	0,161
IR + ATF - IR	39	112	(-289; 366)	0,997
IR + DXM 10 - IR	258	112	(-69; 585)	0,175
IR + DXM 40 - IR	124	112	(-203; 452)	0,801
IR + ATF - IR + C	-214	112	(-542; 113)	0,336
IR + DXM 10 - IR + C	5	112	(-322; 332)	1,000
IR + DXM 40 - IR + C	-129	112	(-456; 199)	0,779
IR + DXM 10 - IR + ATF	219	116	(-121; 559)	0,350
IR + DXM 40 - IR + ATF	85	116	(-254; 425)	0,947
IR + DXM 40 - IR + DXM 10	-134	116	(-474; 206)	0,779

Nivel de confianza individual = 99,30%

Tabla A.7. **Niveles séricos de LDH (UI/L)**. Resultados del análisis comparativo entre los diferentes grupos experimentales.

Diferencia de niveles	Dif. de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor p ajustado
IR + C - IR	17	217	(-625; 660)	1,000
IR + ATF - IR	229	237	(-470; 928)	0,866
IR + DXM 10 - IR	384	237	(-315; 1083)	0,497
IR + DXM 40 - IR	78	237	(-621; 777)	0,997
IR + ATF - IR + C	212	229	(-464; 888)	0,884
IR + DXM 10 - IR + C	367	229	(-309; 1043)	0,510
IR + DXM 40 - IR + C	61	229	(-615; 737)	0,999
IR + DXM 10 - IR + ATF	155	247	(-575; 885)	0,969
IR + DXM 40 - IR + ATF	-151	247	(-881; 579)	0,972
IR + DXM 40 - IR + DXM 10	-306	247	(-1036; 424)	0,729

*Nivel de confianza individual = 99,29%*

**ANEXO II – INDICE DE ABREVIATURAS**

<b>AMS:</b>	Arteria mesentérica superior
<b>ANOVA:</b>	Análisis de la varianza ( <i>analysis of variance</i> )
<b>CK:</b>	Creatín quinasa ( <i>creatin kinase</i> )
<b>DAMP:</b>	Patrones moleculares asociados al daño ( <i>damage associated molecular patterns</i> )
<b>GLT-ALT:</b>	Transaminasa glutámico pirúvica – alanina aminotransferasa
<b>GOT-AST:</b>	Transaminasa glutámico oxalacética – aspartato aminotransferasa
<b>H&amp;E:</b>	Hematoxilina & Eosina
<b>IL:</b>	Interleucina
<b>LDH:</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>MAPK:</b>	proteína cinasas activadas por mitógenos ( <i>mitogen-activated protein kinases</i> )
<b>MDA:</b>	Malonilaldehído
<b>NF-κB:</b>	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas ( <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
<b>NMDA:</b>	ácido N-metil-D-aspartico
<b>NLR:</b>	Receptores tipo Nod ( <i>Nod like receptors</i> )
<b>Nrf-2/HO-1:</b>	factor eritroide regulador multifuncional-2 / hemo oxigenasa-1 ( <i>multifunctional regulator nuclear factor erythroid 2-related factor / hemo oxygenase-1</i> )
<b>OSE:</b>	Epítomos específicos de oxidación ( <i>oxidation specific epitopes</i> )
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>TAC:</b>	Tomografía axial computarizada
<b>TLR:</b>	Receptores tipo Toll ( <i>Toll like receptors</i> )
<b>TNF-α:</b>	Factor de necrosis tumoral tipo alfa ( <i>alpha-like tumoral necrosis factor</i> )
<b>VLDL:</b>	Lipoproteína de muy baja densidad ( <i>very low density lipoprotein</i> )
<b>XD:</b>	Xantina deshidrogenasa
<b>XO:</b>	Xantina oxidasa